

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica**



**TESIS DOCTORAL**

**Excrección urinaria de tromboxano B2 (TxB2) como  
marcador de rechazo en transplante renal humano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Joaquín González Revaldería**

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

TP  
1988  
037



\* 5 3 0 9 8 7 3 0 0 2 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53 - 044229 - 8

**EXCRECCION URINARIA DE TROMBOXANO B<sub>2</sub>  
(TxB<sub>2</sub>) COMO MARCADOR DE RECHAZO EN  
TRANSPLANTE RENAL HUMANO**

Joaquín González Revaldeja

Madrid, 1988



**Colección Tesis Doctorales. N.º 37/88**

**© Joaquín Gonzalez Revaldería**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 - 28015 Madrid  
Madrid, 1988  
Ricoh 3700  
Depósito Legal: M-2155-1988**

I

A QUIENES TANTO DEBO

## II

### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Joaquín Ortuño Mirete por su supervisión y juicios críticos, sin cuya ayuda hubiese sido imposible la consecución de éste trabajo.

A D<sup>a</sup>. Carmen Revaldería por su inquebrantable apoyo durante la realización del trabajo y por su labor mecanográfica en la preparación del original.

Al Dr. D. José Luis Teruel Briones por su amabilidad y paciencia.

A los facultativos del Servicio de Nefrología y, en general, a todo el personal del Hospital Ramón y Cajal por su compañerismo y porque cualquiera puede enseñar algo a quien esté dispuesto a aprender.

A todos aquéllos que con sus consejos y opiniones han colaborado en la forma final del presente trabajo.

### III

#### INDICE

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- BIOQUIMICA DE LAS PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS	1
1.2.- TRANSPLANTE RENAL Y RECHAZO	11
1.3.- INDICADORES DE RECHAZO EN TRANSPLANTE RENAL	15
2.- OBJETIVOS	19
3.- DETERMINACION DE LOS NIVELES URINARIOS DE $TxB_2$	20
3.1.- ELECCIÓN DEL MÉTODO. ANTECEDENTES	20
3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.2.1.- RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS URINARIAS	21
3.2.2.- DIÁLISIS	22
3.2.3.- EXTRACCIÓN	22
3.2.4.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA	23
3.2.5.- RADIOINMUNOENSAYO	24
3.2.6.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS	30
3.3.- RESULTADOS	31
3.3.1.- PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	31
3.3.1.1.- DIÁLISIS	31
3.3.1.2.- EXTRACCIÓN ORGÁNICA	33
3.3.1.3.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA EN FASE REVERSA.	33
3.3.2.- INFLUENCIA DEL pH URINARIO	37
3.3.3.- PRECAUCIONES EN LA MANIPULACIÓN Y ALMA- CENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	37

#### IV

3.3.4.- TRATAMIENTO DE LOS BLANCOS	40
3.3.5.- CÁLCULO DE RESULTADOS	42
3.3.6.- FIABILIDAD DE LA TÉCNICA	44
3.3.6.1.- PARALELISMO	46
3.3.6.2.- PRECISIÓN	46
3.3.6.3.- EXACTITUD	49
3.3.6.4.- ESPECIFICIDAD E INTERFERENCIAS MEDICAMENTOSAS.	51
3.3.6.5.- SENSIBILIDAD	51
3.3.7.- INFLUENCIA DE LOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN	53
3.3.8.- PRESENCIA URINARIA DE CELULAS SANGUINEAS	53
3.3.9.- VALORES NORMALES	56
3.3.10.- INFLUENCIA DE LA CIRUGIA	58
3.4.- DISCUSIÓN	60
4.- $\text{TxB}_2$ EN TRANSPLANTE RENAL HUMANO	67
4.1.- PACIENTES Y MÉTODOS	67
4.1.1.- ENFERMOS	67
4.1.2.- INMUNOSUPRESIÓN	67
4.1.3.- DIAGNÓSTICO DE NECROSIS TUBULAR AGUDA	68
4.1.4.- DIAGNÓSTICO DE RECHAZO	69
4.1.5.- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	72
4.1.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS	73
4.1.6.1.- DETERMINACIÓN DE $\text{TxB}_2$	73
4.1.6.2.- DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CREATININA	73
4.1.6.3.- DETERMINACIÓN DE SODIO Y POTASIO	73

## V

4.1.7.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS	74
4.2.- RESULTADOS	74
4.2.1.- GRUPO A: TRANSPLANTE NO COMPLICADO	75
4.2.2.- GRUPO B: RECHAZO SOBRE INJERTO PREVIAMENTE FUNCIONANTE	77
4.2.3.- GRUPO C: NECROSIS TUBULAR AGUDA SIN RECHAZO	83
4.2.4.- GRUPO D: RECHAZO SOBRE NECROSIS TUBULAR AGUDA PREVIA	83
4.2.5.- SIGNIFICACIÓN DE LAS DETERMINACIONES DE $TxB_2$ Y $TxB_2/Cr$	87
4.3.- DISCUSION	91
5.- CONCLUSIONES	96
6.- BIBLIOGRAFIA	98
7.- APENDICES	117
7.1.- CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE $TxB_2$ MEDIANTE UN CALCULADOR PROGRAMABLE HP-97	117
7.1.1.- MANEJO	117
7.1.2.- LISTADO	118
7.2.- ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y DE REGRESIÓN	119
7.2.1.- MANEJO	119
7.2.2.- LISTADO	121



## VI

### ABREVIATURAS

PG	= Prostaglandina ( $\text{PGA}_2$ , $\text{PGB}_2$ , $\text{PGE}_2$ , $\text{PGI}_2$ )
Tx	= Tromboxano ( $\text{TxA}_2$ , $\text{TxB}_2$ )
PLA	= Fosfolipasa ( $\text{PLA}_1$ , $\text{PLA}_2$ )
EDTA	= Acido etilendiamintetracético.
CLAE-FR	= Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa.
Ag	= Antígeno
$\text{Ag}^*$	= Antígeno marcado radiactivamente.
Ac	= Anticuerpo
$B_0$	= Máxima cantidad de antígeno que puede unirse a una cantidad determinada de anticuerpo en las condiciones de análisis.
$\%B/B_0$	= Fracción de antígeno marcado unido respecto del máximo de unión.
$\bar{x}$	= Media.
DS	= Desviación típica
CV	= Coeficiente de variabilidad
EfNa	= Excrección fraccional de sodio.
$\text{Cr}_s, \text{Cr}_o$	= Concentración plasmática/urinaria de creatinina.
NTA	= Necrosis tubular aguda.
ECO	= Ecografía
6-MP	= 6-metil prednisolona
HD	= Hemodiálisis.

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- BIOQUÍMICA DE LAS PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS

Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos constituyen una familia de compuestos conocida generalmente como eicosanoides o productos de la "cascada del ácido araquidónico". Su importancia fisiológica se ha puesto de relieve durante la última década y son considerados hoy día como un grupo de moléculas mediadoras cuyas dianas se encuentran muy cerca del sitio de síntesis.

Las prostaglandinas muestran una gran variedad de efectos fisiológicos, algunos de los cuales son completamente opuestos. Así, la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), que quizá haya sido la más ampliamente estudiada, es capaz de inducir fiebre, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular (lo que origina la formación de edemas), contracción del músculo liso del útero, etc. ... El tromboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ) produce agregación plaquetaria y broncoconstricción, mientras que la prostaciclina ( $PGI_2$ ) es el más eficaz agente antiagregante plaquetario de origen natural conocido (2). Se ha comprobado, además, que en la diabetes el  $TxA_2$  está aumentado y la  $PGI_2$  disminuida (3, 4). También está aumentado el  $TxA_2$  en el shock endotóxico (5), hidronefrosis (6, 7), nefropatías obstructivas (8), enfermedades coronarias isquémicas (9, 10), lupus eritematoso (11), síndrome hepatorenal (12, 13) e isquemia cerebral (14), entre otros muchos.

Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos derivan enzimáticamente de los ácidos grasos insaturados de 20 átomos de carbono, siendo su principal precursor el ácido araquidónico (ácido *cis*-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico), el cual proviene del ácido graso esencial linoleico (15). Este da lugar a las prostaglandinas de la serie "2", mientras que las formadas a partir del ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico y del eicosapentanoico o timnódico originan, respectivamente, las prostaglandinas de las series "1" y "3". Estos índices hacen referencia al número de insaturaciones que conservan las prostaglandinas en su molécula y que son dos menos que las que posee el ácido graso precursor. Este número es el que se escribe como subíndice cuando se las nombra.

Una vez ingerido en la dieta, el ácido linoleico sufre primero una deshidrogenación catalizada por la  $\Delta^6$ -desaturasa la cual forma un doble enlace *cis* dando lugar al ácido  $\gamma$ -linoleico. Posteriormente la molécula aumenta su longitud en dos átomos de carbono dando lugar al ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico y, por fin, actúa una  $\Delta^5$ -desaturasa rindiendo ácido araquidónico (16), (Figura.1).

---

El ácido araquidónico esterifica la posición  $\beta(6'2)$  de los fosfolípidos (en especial del fosfatidilinositol y de la fosfatidilcolina), como es norma general en los ácidos grasos poliinsaturados (Fig. 2). Sin embargo, para la formación de los eicosanoides ha de estar libre. La enzima que hidroliza la unión del araquidónico al esqueleto carbonado del glicerol es

-3-

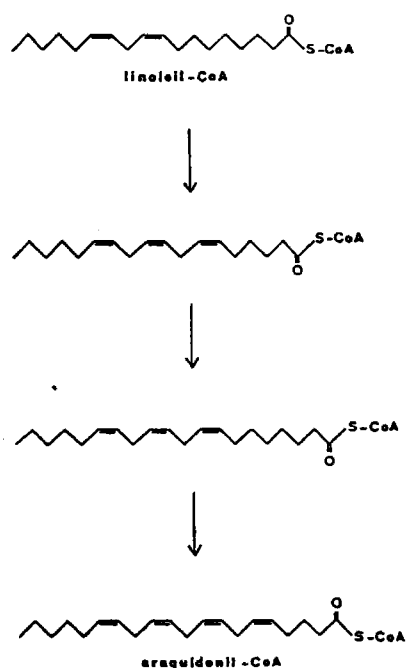


FIGURA 1.- Etapas de formación del araquidonil-CoA a partir del ácido linoleico.

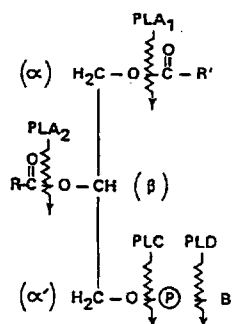


FIGURA 2.- Representación esquemática de una molécula de fosfolípido y de los puntos de ataque enzimático de la fosfolipasa.

R' , R: residuos de ácidos grasos; P: fosfato;  
B: colina, etanolamina, inositol o serina.

la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) y, en menor proporción, las fosfolipasas C y D. El paso hidrolítico es el limitante en la velocidad de producción de los eicosanoides. Esta enzima se activa por una gran cantidad de estímulos tanto mecánicos como físicos, hormonales, inmunológicos, etc... (17). La fosfolipasa  $A_2$  está formada por un grupo heterólogo de enzimas ampliamente distribuidas en las células eucariotas. Este tipo de enzimas se suele dividir en dos grupos:

- Formas unidas a la membrana, las cuales requieren calcio y pH neutro para una actividad catalítica óptima, siendo accesibles desde el exterior celular, y

- Formas solubles, las cuales no requieren calcio y su pH óptimo es ácido.

Tanto la  $PLA_1$  como la  $PLA_2$  se inhiben por un cierto número de compuestos, siendo los más conocidos los glucocorticoides. Estos actúan sobre el núcleo celular induciendo la síntesis de la proteína macrocortina (18) y/o de lipomodulina (19) que son los verdaderos inhibidores de la fosfolipasa. Otros compuestos inhiben las fosfolipasas por interacción con los fosfolípidos, impidiendo el ataque enzimático a estos. Entre ellos se encuentran los compuestos catiónicos del tipo de la mepacrina y la clorpromacina y los poliamínicos como la putrescina y la espermidina. Otro tipo de inhibidores, como el ácido etilendiamintetracético (EDTA), actúan interfiriendo la unión del  $Ca^{2+}$ , que es necesaria para mantener la conformación estructural de la enzima (17).

Una vez liberado, el ácido araquidónico es atacado, bien

por la ciclooxigenasa para dar lugar a las prostaglandinas y tromboxanos, bien por la lipooxigenasa para originar los leucotrienos (Figuras 3 y 4).

La ciclooxigenasa o prostaglandina endoperóxido sintetasa (EC 1.14.99.1) presenta dos tipos de actividad enzimática. En primer lugar actúa la actividad oxigenasa introduciendo dos átomos de oxígeno en las posiciones 9 y 11 de la molécula de ácido araquidónico, dando lugar a un producto intermedio, el hidroperoxiendoperóxido  $\text{PGG}_2$ , que posee una vida media de 5 minutos en medio acuoso y a pH fisiológico. Inmediatamente actúa sobre  $\text{PGG}_2$  la actividad peroxidásica liberando el hidroxiendoperóxido  $\text{PGH}_2$  junto con especies oxidadas de estructura no conocida (20). Esta enzima es una glicoproteína que contiene 12 moles de manosa y 5 de N-acetilglucosamina por mol de enzima. Su peso molecular es de 126.000 siendo el de la cadena polipeptídica de 69.000 (21). Para la primera actividad la enzima precisa del grupo hemo, el cual está muy debilmente unido y de triptófano u otro agente reductor para proteger a la enzima de la acción peroxidásica. Este agente se consume estequiometricamente al reducir el grupo hidroperóxido intermediario (22).

La ciclooxigenasa es una enzima muy ampliamente distribuida de la que se ha secuenciado su extremo amino terminal (23). Es inhibida irreversiblemente por la aspirina mediante la acetilación de una serina del centro activo, que se encuentra en el extremo amino terminal y, reversiblemente, por los antiinflamatorios no esteroídicos del tipo de la indometacina (24), que actúan sobre dos sitios: el centro activo, lo que determina la potencia de

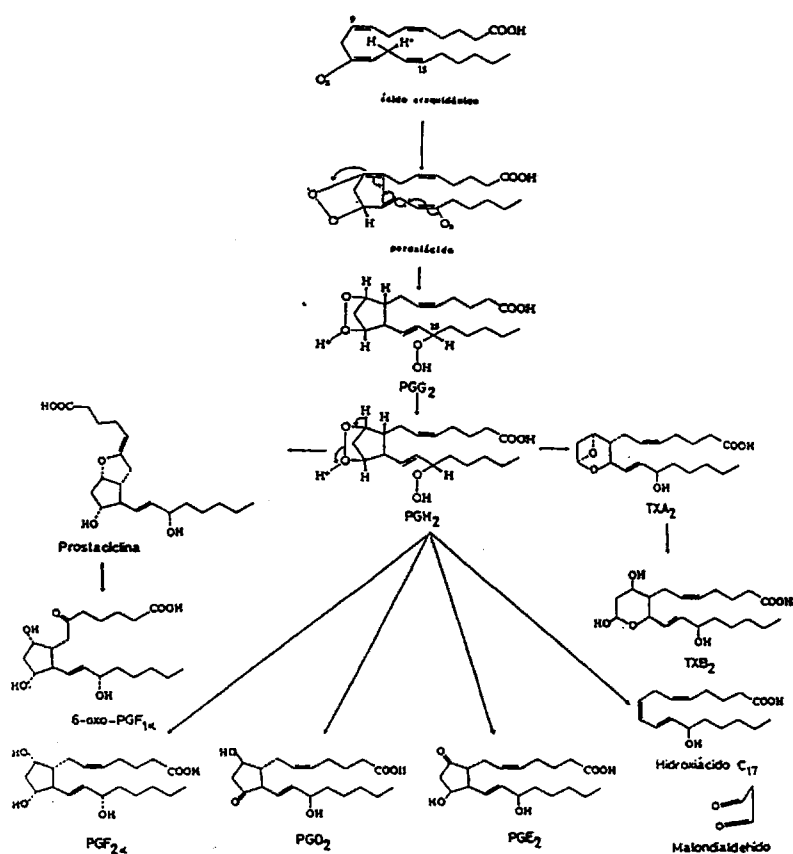


FIGURA 3.- Formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (via de la ciclooxygenasa).

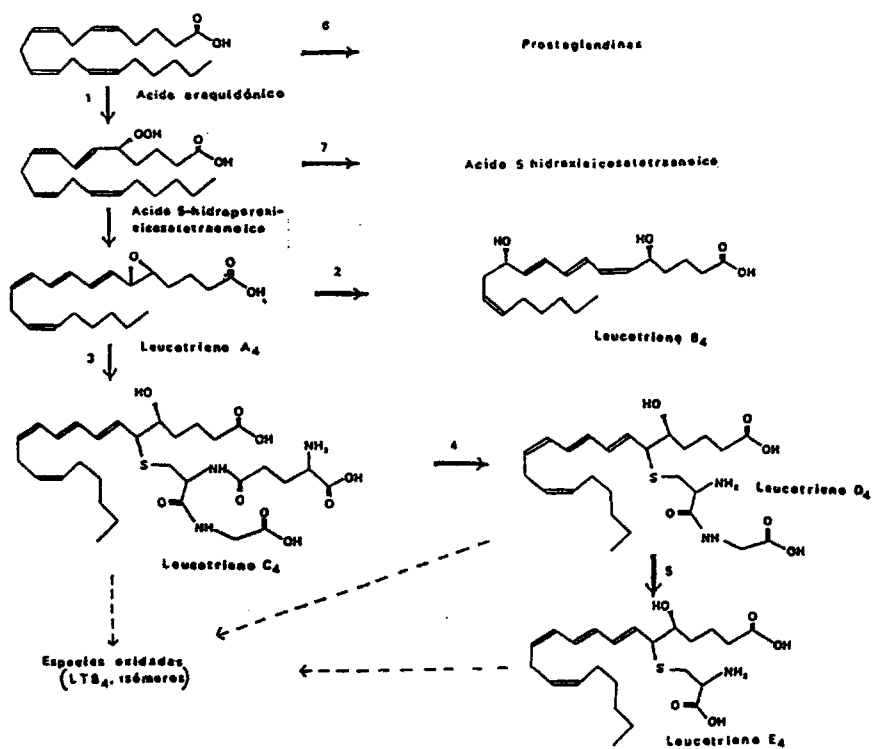


FIGURA 4.- Formación de leucotrienos a partir del ácido araquidónico (vía de la lipooxigenasa).

- 1: 5-lipooxigenasa
- 2: Leucotrieno A<sub>4</sub> epóxido hidrolasa
- 3: Glutathion transferasa
- 4: γ-Glutamil-transpeptidasa
- 5: Cisteinil-glicina dipeptidasa
- 6: Ciclooxygenasa
- 7: Glutathion peroxidasa



la acción de estos compuestos, y el sitio suplementario, con el cual debe existir también una interacción para una adecuada eficacia inhibidora(25).

A partir de los endoperóxidos cíclicos se forman las distintas prostaglandinas y tromboxanos. Para el  $\text{TxA}_2$  y la  $\text{PGI}_2$  se han identificado sintetetasas pero para las restantes prostaglandinas no se sabe con seguridad si su formación está catalizada enzimáticamente (20), aunque se ha llegado a aislar una enzima con actividad sintetasa de  $\text{PGE}_2$  (26).

Existen distintos tipos de prostaglandinas; así, las de la serie E son  $\beta$ -hidroxiacetonas; las de la F, dioles 1,3; las de la A, cetonas  $\alpha, \beta$ -insaturadas; el  $\text{TxA}_2$ , un hemiacetal lábil, etc... En cada célula, al activarse la cascada del ácido araquidónico se forma una mezcla de prostaglandinas predominando unas sobre otras dependiendo de la célula, tejido o especie de que se trate.

La tromboxano sintetasa es una enzima que ha sido solubilizada y separada de la ciclooxigenasa (27, 28), la cual actúa isomerizando la  $\text{PGH}_2$  a  $\text{TxA}_2$  y, en las plaquetas, que es donde principalmente se sintetiza el  $\text{TxA}_2$ , se localiza en el sistema tubular denso. Esta enzima es inhibida específicamente por el imidazol (29).

El  $\text{TxA}_2$  (Figura 3) posee en su molécula un anillo oxano y un grupo hidroxilo hemiacetalico. Fue identificado por vez primera por Samuelsson (30) al estudiar el metabolismo de los ácidos grasos en las plaquetas. Este compuesto resultó ser el responsa-

ble de la constricción de la aorta de conejo que se había detectado anteriormente por bioensayo (31). Recientemente se ha sintetizado químicamente, a partir de  $\text{TxB}_2$ , un compuesto con la estructura asignada por Samuelsson al  $\text{TxA}_2$ , comprobándose que posee las mismas propiedades fisiológicas que éste, por lo que se considera correcta la primera estructura propuesta para el compuesto fisiológicamente activo (32).

El  $\text{TxA}_2$  en medio acuoso y a pH fisiológico es inestable, teniendo una vida media de 32 s. Este compuesto se transforma en  $\text{TxB}_2$ , que es el ácido 8 - (1-hidroxí-3-oxopropil)- 9,12 L-dihidroxí- 5,10 - heptadecadienoico, por medio de un ataque nucleofílico del agua. El  $\text{TxB}_2$  es estable pero posee poca actividad biológica.

Las prostaglandinas, en general, se degradan por medio de oxidaciones que conducen a una marcada pérdida de actividad biológica. En la Figura 5 se muestra la ruta de degradación más habitual de las prostaglandinas, existiendo también, procesos de  $\beta$  y  $\omega$ -oxidación (20). El paso limitante es la conversión catalizada por la 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa. Esta enzima y la  $\Delta^{13}$ -prostaglandina reductasa utilizan  $\text{NAD}^+$  como cofactor (33), aunque la segunda puede utilizar también  $\text{NADP}^+$ , dependiendo del tipo de célula en que se encuentre (34).

El  $\text{TxB}_2$ , producto de degradación del  $\text{TxA}_2$ , puede sufrir posteriores modificaciones en su molécula, habiéndose identificado hasta 20 metabolitos urinarios (35-38), siendo los principales el 2,3-dinor- $\text{TxB}_2$  y el 2, 3, 4, 5-tetranor- $\text{TxB}_2$  (Figura 6),

-10-

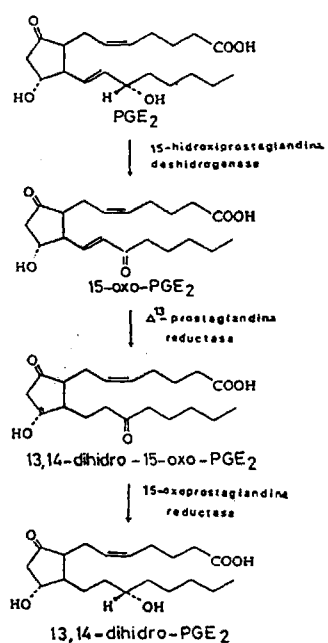


FIGURA 5.- Catabolismo de los productos formados en la vía de la ciclooxigenasa.

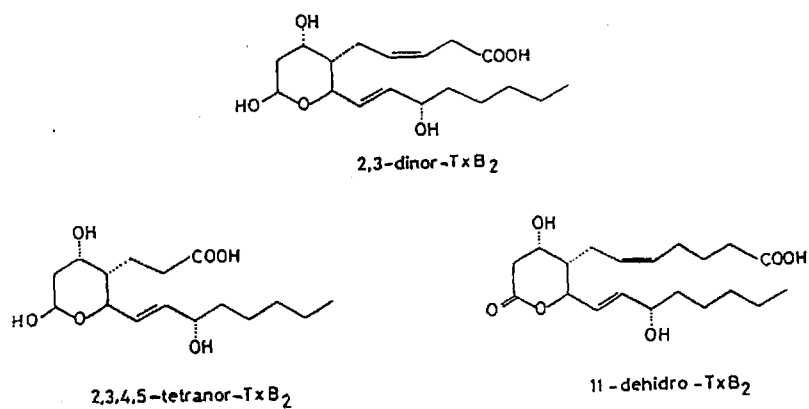


FIGURA 6.- Principales productos de degradación del TxB<sub>2</sub>

los cuales son productos de  $\beta$ -oxidación (39). El siguiente catabolito en importancia resulta de la deshidrogenación del alcohol hemiacetalico lo que da lugar al 11-dehidro-TxB<sub>2</sub>. Este compuesto puede sufrir posteriormente una deshidrogenación de alcohol del carbono 15 y reducción de los dobles enlaces  $\Delta^5$  y  $\Delta^{13}$ . Un grupo minoritario de metabolitos excretados son compuestos no cíclicos con grupos hidroxilo en C-11 y C-12.

#### 1.2.-TRANSPLANTE RENAL Y RECHAZO.

El transplante renal es un tratamiento habitual, casi rutinario, de la insuficiencia renal crónica. Sin embargo, aunque cada día se obtienen mejores resultados, el rechazo del injerto constituye el principal problema del transplante, ocasionando del 75% al 80% de las causas de pérdida del riñón (40).

En la actualidad el diagnóstico de rechazo se realiza basándose en el siguiente conjunto de parámetros.

\* Signos y síntomas clínicos:

- Fiebre
- Aparición de edemas
- Hipertensión arterial
- Dolor sobre el injerto
- Malestar general, astenia, ...
- Disminución de la diuresis

\* Parámetros analíticos:

- Aumento de urea y creatinina plasmática o disminución acusada de su ritmo de descenso.
- Disminución de la excrección urinaria de  $\text{Na}^+$
- Proteinuria

\* Ecografía:

- Aumento del tamaño de la silueta renal
  - Hipertrofia de las pirámides renales
  - Disminución de los ecos del seno renal
- Este procedimiento detecta la presencia de masas en la pelvis: linfocèle, hematoma o urinoma. Asimismo, la ecografía se utiliza para detectar procesos obstructivos.

\* Histología:

- Presencia de infiltrados intersticiales y perivasculares de células mononucleadas.
- Edema intersticial
- Extravasación eritrocitaria

\* Procedimientos isotópicos:

- Los estudios con  $^{99}\text{Tc}$  y plaquetas marcadas con Indio suministran información sobre la vascularización del órgano transplantado. Una pobre vascularización del injerto puede estar presente en procesos de rechazo.

\* Arteriografía:

- Detección de lesiones en las principales arterias.

Ninguno de estos datos es específico de rechazo, lo que implica serias dificultades diagnósticas y decisiones terapéuticas erróneas. Por otro lado, muchos de ellos -y en concreto los más fiables- son datos o parámetros funcionales, cuya significación y utilidad disminuye o se anula completamente si el riñón, antes del rechazo, no funcionaba por otro motivo (necrosis tubular isquémica). Por último, las alteraciones sugestivas de rechazo son tardías: se manifiestan cuando la lesión histológica de rechazo está ya evolucionada.

Por tanto la búsqueda de un marcador de rechazo precoz, específico, fiable, de sencilla determinación y económico es de fundamental importancia para el mejor manejo del enfermo transplantado ya que permitiría instaurar precozmente la terapia adecuada.

Aunque el mecanismo de rechazo no se comprende totalmente, cada vez es mayor el conocimiento que se va logrando de este fenómeno (41-53). En la Figura 7 se muestra un esquema de la respuesta inmune no modificada que tiene lugar ante la presencia de antígenos extraños.

Mediante procedimientos histológicos se ha demostrado que las primeras células que invaden los injertos renales son linfocitos y monocitos (54) existiendo un número relativamente pequeño de células B pero con una respuesta proliferativa muy acusada.

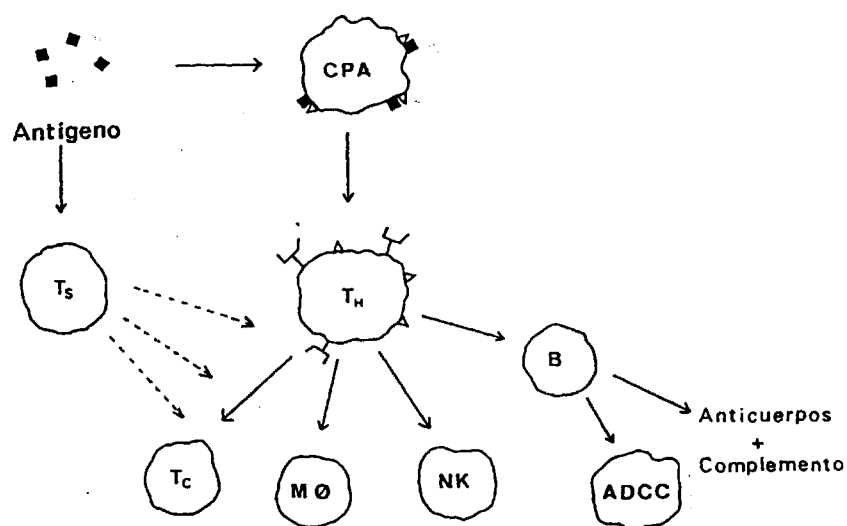


FIGURA 7.- Esquema de la regulación de la respuesta inmune en el rechazo.

CPA: Célula presentadora de antígeno (dendritica, macrófago)  
 TH: Linfocito T colaborador  
 TS: Linfocito T supresor  
 B: Linfocito B  
 TC: Linfocito T citotóxico  
 M Ø: Macrófago  
 NK: Células asesinas  
 ADCC: Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos  
 →: Estimulación  
 --->: Inhibición

Las plaquetas también están íntimamente ligadas al rechazo. En los injertos rechazados existe una rápida agregación plaquetaria (55) que casi coincide temporalmente con el aumento de la inflamación. Tanto en la activación plaquetaria (30, 56) como en la de los otros tipos celulares que intervienen en los procesos de rechazo se sintetizan y secretan metabolitos del ácido araquidónico. Así, los macrófagos estimulados sintetizan y secretan tromboxano  $B_2$  durante la fagocitosis (57) y en respuesta a los últimos componentes del complemento (58). De igual manera los linfocitos humanos en suspensiones libres de plaquetas son capaces de sintetizar  $TxB_2$  (59) al igual que los leucocitos polimorfonucleares (60). Por su parte, el  $TxA_2$  es capaz de estimular tanto la proliferación como la toxicidad de los linfocitos (61-63).

### 1.3.- INDICADORES DE RECHAZO EN TRANSPLANTE RENAL

En la búsqueda de un diagnóstico precoz y fiable del rechazo se han propuesto distintos marcadores. Entre ellos se encuentra la determinación de diversas enzimas séricas y urinarias. Así, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa urinaria (69) presenta una elevación aproximadamente 1'5 días antes del diagnóstico clínico de rechazo en el 70% de los casos. Sin embargo no parece ser específica de este proceso ya que la oligoanuria, hipotensión, estenosis de la arteria renal y la administración de gentamicina también la elevan, tardando en normalizarse de 5 a 6 días tras



la desaparición de las causas. Asimismo se ha estudiado la determinación de la lisozima sérica y urinaria (65). Esta ha resultado ser un eficaz marcador de daño tubular pero no es específica del rechazo. La adenilato quinasa urinaria (66) ha mostrado su utilidad en el diagnóstico del rechazo, al menos en los 6 primeros días postransplante, pero no se eleva precozmente y se propone mas bien para el seguimiento de la eficacia del tratamiento anti-rechazo.

Otras enzimas estudiadas han sido las glicosidasas lisosomales, la adenosin desaminasa, la muramidasa, láctico deshidrogenasa, fosfatasas ácida y alcalina,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa, leucina aminopeptidasa y málico deshidrogenasa (67-70). Ninguno de ellos posee gran utilidad en el diagnóstico de rechazo.

Se han investigado otras proteínas como posibles marcadores (71) prestando especial atención a la proteína C reactiva (72-74) la cual presenta un bajo número de falsos positivos y negativos. Su mayor inconveniente es que no posee valor predictivo alguno. Mucho interés se ha puesto en la determinación de  $\beta$ 2-microglobulina (75, 76) pero este parámetro resulta también alterado por la necrosis tubular aguda y sus niveles no se modifican precozmente respecto del diagnóstico clínico.

El estudio de parámetros inmunológicos como la formación de rosetas E (77), la no respuesta a mitógenos (78), los ensayos de células T funcionales (79), anticuerpos monoclonales (80) o el análisis de inmunoglobulinas y fracciones del comple-

mento (81) no han sido eficaces, principalmente debido a su falta de valor predictivo, no siendo tampoco concluyentes los ensayos realizados con prostaciclina, plaquetas marcadas radiactivamente y estudios con coloides de  $^{99m}\text{Tc Sn}$  (82-84).

Debido a los cambios histológicos que tienen lugar durante los procesos de rechazo, últimamente se ha propuesto la realización de biopsias rutinarias con aguja fina (85, 86) para controlar la evolución del injerto. También se ha propuesto que el análisis de la activación celular que tiene lugar durante es tos procesos (87, 88) puede resultar efectivo en el diagnóstico de rechazo. Sin embargo, las primeras suponen un procedimiento agresivo para el paciente, aunque este hecho se vea reducido por el empleo de la técnica con aguja fina, y los segundos precisan de una tecnología muy sofisticada.

La determinación de los productos formados durante los procesos de activación celular no es, en general, tan agresiva como las anteriores y pueden ser tanto o más específicas que aquéllas. Como el  $\text{TxA}_2$  se sintetiza en múltiples tipos celulares que son activados durante el proceso del rechazo y, a su vez, es capaz de estimular distintos aspectos de la respuesta inmune, su evaluación a través de su metabolito estable, el  $\text{TxB}_2$ , puede constituir un marcador útil del rechazo frente a la creatinina sérica y los parámetros clínicos habitualmente utili zados. La determinación de los niveles urinarios de  $\text{TxB}_2$  representa, por otra parte, un procedimiento no invasivo, lo cual es un requisito esencial para un indicador adecuado de diagnóstico.

Apoyando esta hipótesis se encuentra el hecho de que durante el proceso de rechazo se ha encontrado un aumento en la síntesis de  $\text{TxB}_2$  en perros (89) y en ratas (90). Foegh y cols. han realizado un estudio en 12 enfermos transplantados (91, 92) mostrando resultados prometedores en este sentido. Asimismo, se ha evidenciado en un modelo experimental en ratas (93) que el tratamiento de estas con inhibidores de la síntesis de  $\text{TxB}_2$  prolonga significativamente la supervivencia del injerto antes de la aparición de rechazo.

## 2.- OBJETIVOS

El presente trabajo pretende:

- 1.- Desarrollar una técnica útil para la determinación de  $\text{TxB}_2$  en orina.
- 2.- Estudiar su utilidad en el diagnóstico de rechazo y compararla con la de los indicadores habituales.
- 3.- Aclarar la influencia del acto quirúrgico, de la necrosis tubular aguda post-transplante y de otros factores en los niveles de  $\text{TxB}_2$  urinario.

### 3.- DETERMINACION DE LOS NIVELES URINARIOS DE TxB<sub>2</sub>

#### 3.1.- ELECCIÓN DEL MÉTODO. ANTECEDENTES.

Historicamente, y dejando aparte los bioensayos (94-96), los primeros métodos utilizados en el análisis de los derivados del ácido araquidónico fueron la espectrofotometría y la cromatografía gas-líquido (97). Estos ensayos se caracterizan por poseer una especificidad relativamente elevada pero son poco sensibles ya que requieren de 0'2 a 20 µg, de muestra como mínimo.

En la década de los setenta se utilizaron técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (98, 99) que son muy específicas pero requieren un equipo caro y complejo, consumen bastante tiempo y necesitan cantidades de muestra elevadas, lo que conlleva largos procesos de purificación.

Posteriormente se introdujeron las técnicas de radioinmunoensayo (100). Estos métodos poseen una gran sensibilidad, no necesitan de un equipamiento caro y/o complejo y poseen una alta especificidad, ya que, debido a su estructura, las prostaglandinas y tromboxanos son antígenos a partir de los cuales pueden obtenerse anticuerpos de elevada especificidad. Estos métodos permiten, además, la realización simultánea de un elevado número de determinaciones (101).

Estos hechos hacen que pueda considerarse el radioinmunoensayo como la técnica de elección para la determinación de los niveles urinarios de  $\text{TxB}_2$ . No obstante, hay que observar que ciertos productos de degradación de este metabolito, al poseer estructuras anulares idénticas a la suya, pueden reaccionar en mayor o menor extensión con el anticuerpo. Así, en el caso del  $\text{TxB}_2$ , el 2,3-dinor- $\text{TxB}_2$  (Figura 6) es capaz de reaccionar hasta en un 40% con el anticuerpo anti  $\text{TxB}_2$ . Este hecho hace que cuando se hable de niveles de  $\text{TxB}_2$  determinados por radioinmunoensayo haya que pensar en un conjunto de entidades con estructuras químicas muy semejantes y con un mismo origen (la transformación catabólica del  $\text{TxB}_2$ ) (38). A este conjunto se le suele denominar " $\text{TxB}_2$  inmunorreactivo" o "sustancias del tipo del  $\text{TxB}_2$ ".

### 3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.2.1.- RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS URINARIAS

Se recogieron orinas de 24 horas de los sujetos estudiados, en recipientes de polipropileno sobre 40 mg de indometacina a una concentración final de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, suficiente para inhibir la posible generación de  $\text{TxB}_2$  por parte de las células que pueden aparecer ocasionalmente en la orina de éstos pacientes (60). Una vez terminada la recolección, se centrifugó una alícuota de 10 ml de cada orina a  $4^\circ\text{C}$  y 1000 g durante 10

minutos, conservándose alicuotas de la misma de 3 ml en tubos de prolipropileno a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### 3.2.2.- DIALISIS

Se investigó la posible presencia de sustancias interferentes mediante un experimento de diálisis. Estos interferentes podrían ser capaces de alterar el equilibrio antígeno-anticuerpo y/o de adsorberse sobre las partículas de carbón revestidas de dextrano con mayor afinidad que los antígenos libres impidiendo, de éste modo, su separación del medio de reacción.

Se dializaron 5 orinas (alícuotas de 2 ml ) con una membrana de 4'8 nm. de tamaño medio de poro (límite de exclusión molecular de 12.000) durante 15 h. frente a 1.000 volúmenes de agua a  $4^{\circ}\text{C}$  con un intercambio en la octava hora. Al finalizar el proceso, se añadió  $\text{TxB}_2$  a las distintas muestras para obtener distintas concentraciones del metabolito.

### 3.2.3.- EXTRACCIÓN

Las muestras urinarias (1 ml ) fueron acidificadas a pH 3'5 con ácido fórmico 2M (Merck), midiendo el pH con un potenciómetro (CRISON, pH/mVmeter digit 501) y con tiras reactivas de alta sensibilidad (Spezialindikator-papier y Urines indikator-

papier, Merck). Posteriormente fueron extraídas, una vez, con un volúmen doble de cloroformo o acetado de etilo (Merk), los cuales se muestran apropiados para la extracción de prostaglandinas y tromboxanos (102).

Tras agitar cada tubo durante 30 s. y centrifugarlos durante 5 minutos a 1.000 g y temperatura ambiente, se tomaron 1,8 ml de la fase orgánica (superior en las extracciones con acetato de etilo e inferior en las extracciones con cloroformo), evaporándose éstas a sequedad en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Después se resuspendió el extracto en el mismo volúmen de tampón fosfato (muestras para radioinmunoensayo) o fase móvil inicial (muestras para cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa; CLAE-FR).

Para determinar la efectividad de la extracción se adicionó  $^3\text{H-TxB}_2$  a 10 muestras de orina, contándose su radiactividad tras la extracción. Asimismo se extrajeron por duplicado con cada extractante distintas soluciones acuosas de  $\text{TxB}_2$  de concentración conocida estudiándose la linealidad de ambas curvas.

#### 3.2.4.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Las muestras urinarias fueron extraídas previamente a ser sometidas al proceso cromatográfico, el cual se llevó a cabo con un equipo Waters compuesto por dos bombas de doble cabeza con pistón alternante M-510, un inyector de volúmen variable



de hasta 2 ml de capacidad U6K, un detector ultravioleta Lambda Max M-841, un programador de gradientes M-680 y un registrador-integrador M-730. La columna utilizada fue una  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> de compresión radial (8 x 100 mm) de 10  $\mu$ m de tamaño de partícula. En todos los casos se utilizó una longitud de onda de 210 nm y un flujo de 2 ml/min.

Los disolventes orgánicos utilizados fueron de pureza cromatográfica (Merck, Scharlau) prefiltrados a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m y desgasificados con ultrasonidos (Brandsonic-12) durante 15 minutos previamente a su utilización. El agua utilizada fue bidestilada, prefiltrada a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m y desgasificada a vacío con agitación continua durante 20 minutos.

Se ensayaron eluciones tanto isocráticas como con gradientes (lineales, cóncavos y convexos), para conseguir el pico más estrecho y simétrico en las muestras cromatografiadas.

Las fracciones eluidas se recogieron en un colector LKB-2112 REDIRAC a distintos tiempos, para ser sometidas posteriormente a radioinmunoensayo o conteo de radiactividad.

### 3.2.5.- RADIOINMUNOENSAYO

Para la determinación de los niveles de TxB<sub>2</sub> en orina por radioinmunoensayo se han utilizado los componentes de un equipo comercial fabricado por la firma New England Nuclear (Drieich, RFA) para determinaciones plasmáticas.

El principio del ensayo es la inhibición competitiva de la unión del antígeno marcado radiactivamente ( $^3\text{H-TxB}_2$  en éste caso) a un anticuerpo específico (Ac) por parte del antígeno sin marcar ( $\text{TxB}_2$ ). Este equilibrio se rige por la ley de acción de masas (103).

El antígeno marcado utilizado posee una actividad de  $50 \mu\text{Ci/nmol}$  ( $1.860 \text{ kBq/nmol}$ ) y se obtiene enzimáticamente a partir del ácido (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15- $^3\text{H}_8$ )-araquidónico. El anticuerpo se obtiene por inmunización de conejos con un conjugado de  $\text{TxB}_2$  y albúmina bovina. El ensayo se realiza en un medio tampón fosfato  $50 \text{ mM}$  ( $\text{pH}=7,3$ ) con  $0.1\%$  de gelatina (utilizada para revestir las paredes de los tubos de grupos polares y evitar así la adsorción sobre ellos de las inmunoglobulinas) y  $0.01\%$  de t<sub>merosal</sub> como conservante.

En cada análisis se determinó la unión inespecífica (tubos en los que sólo hay tampón y  $^3\text{H-TxB}_2$ ) y el máximo de unión (tubos en los que hay  $^3\text{H-TxB}_2$  y Ac, pero no  $\text{TxB}_2$ ), el cual es necesario para calcular el porcentaje de unión de los antígenos de patrones y problemas. También se incluyeron tubos para la medida de la actividad del  $^3\text{H-TxB}_2$  que se adiciona a todos los tubos ("totales"), los cuales sólo llevan antígeno marcado diluido con tampón al volumen final de todas las muestras; su radiactividad se mide directamente, sin someterlos al proceso de separación. A partir del conteo de estos tubos y del máximo de unión, se puede calcular el porcentaje de unión del antígeno al anticuerpo mediante la expresión:

$$\frac{M - B}{T - B} \times 100$$

M = Media de las cuentas del máximo de unión.

B = Media de las cuentas del blanco.

T = Media de las cuentas del total.

Las soluciones patrón de trabajo se obtuvieron mediante diluciones seriadas, realizadas en cada ensayo, a partir de una solución de 100 ng/ml (227'2 nmol/l) de  $\text{TxB}_2$  (solución P) según el siguiente esquema:

- |    |  |   |            |
|----|--|---|------------|
| a) | 200 $\mu$ l solución P + 1'8 ml tampón |   |            |
| b) | 2'0 ml solución a + 2'0 ml             | " | 5'0 ng/ml  |
| c) | 2'0 ml solución b + 2'0 ml             | " | 2'5 ng/ml  |
| d) | 2'0 ml solución c + 3'0 ml             | " | 1'0 ng/ml  |
| e) | 2'0 ml solución d + 2'0 ml             | " | 0'5 ng/ml  |
| f) | 2'0 ml solución e + 2'0 ml             | " | 0'25 ng/ml |
| g) | 2'0 ml solución f + 3'0 ml             | " | 0'10 ng/ml |
| h) | 2'0 ml solución g + 2'0 ml             | " | 0'05 ng/ml |

Cuanto mayor es la concentración de  $\text{TxB}_2$  (de patrones o problemas), menos moléculas de  $^3\text{H-TxB}_2$  estarán unidas al Ac con lo cual la radiactividad de esta fracción será menor, aumentando la que contenga a los antígenos libres (104).

Las muestras urinarias y los patrones tras la extracción y/o cromatografía se sometieron al esquema de trabajo mostrado en la Tabla I.

TABLA I.- VARIABILIDAD DE LA TÉCNICA DE RADIOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES URINARIOS DE  $TxB_2$ .

	ACTIVIDAD TOTAL	VOLÚMEN/TUBO (ul) *		PATRONES O PROBLEMAS	INESPECIFICA DE PROBLEMAS
		"CERO" DE UNIÓN	UNIÓN INESPECÍFICA		
TAMPÓN FOSFATO	900	300	400	200	300
PATRÓN O PROBLEMA	-	-	-	100	100
$^3H$ - $TxB_2$	100	100	100	100	100
ANTICUERPO	-	100	-	100	-

\* Todos los ensayos se realizaron por duplicado

Después de agitar los tubos tras la adición de cada reactivo, se incubaron estos 20 horas a 4°C. Posteriormente, se mantuvieron durante 10 minutos a 0°C en baño de hielo y se añadieron 500 µl de una suspensión al 0'5% de carbón neutro Norit A y 0'5% de Dextran T-70 en tampón fosfato 10 mM, agitando inmediatamente los tubos. Al cabo de 15 minutos de incubación en el baño de hielo, se centrifugaron estos en una centrífuga refrigerada IEC PR-6.000 durante 10 minutos a 1.000 g y 4°C con lo que en el sobrenadante quedaron los complejos  $\text{TxB}_2\text{-Ac}$  y  $^3\text{H-TxB}_2\text{-Ac}$  y en el precipitado, los antígenos libres ( $\text{TxB}_2$  y  $^3\text{H-TxB}_2$ ) (Figura 8). Se tomaron 0'7 ml de sobrenadante y se transfirieron a viales de vidrio de 20 ml de capacidad, añadiendo 10 ml de líquido de centelleo ATOMLIGHT (New England Nuclear), contándose su radiactividad en un contador de centelleo para emisores beta, (Mark II Nuclear Chicago, Searle), a 4°C, con una eficiencia de conteo para tritio del 60%.

Una vez conocida la actividad de cada muestra, se construyó una curva de calibrado representando en abscisas la concentración de antígeno (o una función de la misma) y en ordenadas una función del porcentaje de unión de la fracción libre o de la unidad, respecto del máximo de unión. Por interpolación en estas curvas se obtiene la concentración de antígeno de los problemas.

El material empleado en todo momento en la manipulación de las muestras (contenedores, tubos, puntas de pipetas, etc ...) fue de polipropileno.

Se estudió la fiabilidad general de la técnica en los aspectos de:

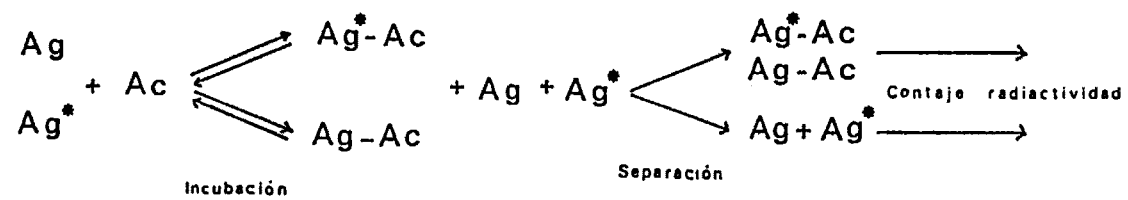


FIGURA 8.- Esquema de un proceso de radioinmunoensayo.

- paralelismo
- precisión
- exactitud
- especificidad e interferencias medicamentosas
- sensibilidad

así como las condiciones mas adecuadas para su desarrollo:

- pH óptimo de la extracción orgánica
- material de manipulación de las muestras y reactivos
- condiciones de almacenamiento de las muestras
- tratamiento de los blancos
- influencia de los tiempos de incubación.

También se determinó el rango de normalidad de los niveles de  $\text{TxB}_2$  en orina y la influencia que sobre estos ejercen la presencia de células sanguíneas y la cirugía (laparotomía exploratoria).

### 3.2.6.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

Los resultados del proceso de radioinmunoensayo se analizaron utilizando la curva de dosis-respuesta que mejor se ajustó matematicamente a la distribución experimental de los patrones. El estudio de las curvas de calibrado en coordenadas logit-log (105) y de los coeficientes de variabilidad se llevó a cabo mediante un programa escrito para una calculadora programable HP-97, el cual, además de proporcionar las concentraciones interpoladas de los problemas, suministra la ecuación de la rec

ta de calibrado y su coeficiente de correlación. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación típica ( $\bar{x} \pm DS$ ), excepto los valores normales de  $TxB_2$  urinario que se expresan como  $\bar{x} \pm 2DS$ .

### 3.3.- RESULTADOS

#### 3.3.1.- PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

##### 3.3.1.1.- DIALISIS

La realización directa del radioinmunoensayo sobre las muestras urinarias centrifugadas, tanto en orinas de sujetos sanos como de transplantados, adicionando o no  $TxB_2$  exógeno, conduce a contajes de radiactividad superiores a los del máximo de unión (o sea, valores de la fracción de antígeno marcado ligado superiores al 100%). En todos los casos el pH de las disoluciones de cada tubo en dónde se llevaron a cabo los ensayos fue el mismo del tampón fosfato utilizado (7'3).

El análisis por radioinmunoensayo de las muestras dializadas aparece en la Figura 9 en dónde se puede observar que el proceso de diálisis elimina en gran medida las interferencias, posibilizando el análisis de las mismas. Sin embargo, este proceso es lento y no plenamente eficaz por lo que se impone la utilización de un método alternativo de purificación (102, 106-113).



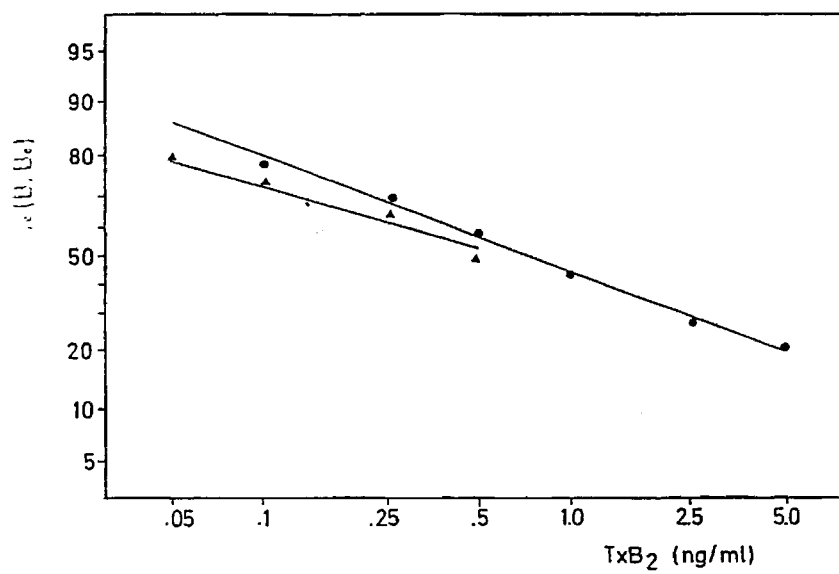


FIGURA 9.- Representación de una curva de calibrado (●) y de las mismas concentraciones de  $\text{TxB}_2$  analizadas en orinas dializadas (▲).

### 3.3.1.2.- EXTRACCIÓN ORGÁNICA

Se extrajeron 10 muestras de orina a las que se adicionaron 1.400 cpm de  $^3\text{H-TxB}_2$  según el esquema expuesto en el apartado 3.2.3., tanto con cloroformo como con acetato de etilo. La extracción con cloroformo resulta ser ligeramente mas efectiva ( $90\% \pm 2'9\%$ ) que la realizada con acetato de etilo ( $83 \pm 3'1\%$ ), presentando el primero la ventaja de una más fácil evaporación. Asimismo, se extrajeron soluciones de  $\text{TxB}_2$  de concentración conocida con ambos disolventes, obteniendo una mejor correlación con cloroformo ( $r = 0'9963$ ) que con acetato de etilo ( $r=0'9817$ ).

### 3.3.1.3.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA EN FASE REVERSA (CLAE-FR).

Las condiciones más adecuadas de elución del  $\text{TxB}_2$  se determinaron inyectando en el cromatógrafo muestras acuosas de concentración conocida una vez extraídas y reconstituídas en la fase móvil. En la Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido al eluir 5  $\mu\text{g}$  de  $\text{TxB}_2$  en condiciones isocráticas de acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético (26: 74: 0'02, vol/vol/vol,  $\text{pH} = 3$ ) que son similares a las que se han utilizado en el análisis general de prostaglandinas (111, 114-117). El pico aparece a un tiempo de retención de 32 minutos, siendo ancho y ligeramente asimétrico. Para disminuir el tiempo durante el cual eluye el  $\text{TxB}_2$ , se ensayaron gradientes tanto lineales como con

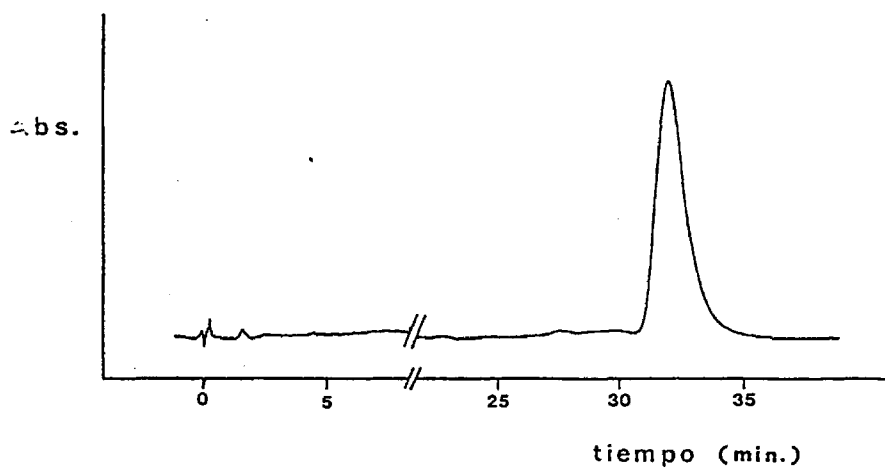


FIGURA 10.- Cromatograma obtenido al analizar una muestra acuosa de  $\text{TxB}_2$ .  
Condiciones: elución isocrática con  $\text{CH}_3\text{-CN}:\text{H}_2\text{O}$  (23: 76) a  $\text{pH}=3$   
Flujo: 2 ml/min.  
Volumen de inyección: 25  $\mu\text{l}$ .  
Longitud de onda: 210 nm.

cavos y convexos. En la Figura 11 se muestra con línea continua el pico obtenido tras eluir una muestra isocráticamente durante 30 minutos con acetonitrilo-agua-á. trifluoroacético (20: 80: 0'02) seguido de un gradiente ligeramente cóncavo (línea 8 del programador) durante 10 minutos hasta unas condiciones finales de acetonitriloagua-á. trifluoroacético (40: 60: 0'02). Tras cada análisis se limpió la columna durante 15 minutos con acetoni-trilo al 100%. De esta manera, se consigue un pico de absorción simétrico y estrecho cuyo tiempo de retención es de  $39'1 \pm 0'04$  min. (n=10) y que eluye en, aproximadamente, 1 minuto. En la Figura 11 se representa en línea de puntos el radiocromatograma obtenido tras inyectar 5.300 cpm de  $^3\text{H-TxB}_2$  y recoger fracciones cada minuto. La recuperación de la radiactividad resulta ser del  $79\% \pm 3\%$  (n=9), siendo el coeficiente de variabilidad intramétodo del 9% (n=10) y día a día, del 13% (n=10). En la Figura 12 se muestra el cromatograma que se obtiene tras extraer una muestra urinaria a la que se habían añadido 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{TxB}_2$ . El pico del metabolito muestra un coeficiente de resolución,  $R_s$ , de 0'9, siendo la eficacia de la columna,  $N$ , de 11.000 platos teóricos. La mínima cantidad de  $\text{TxB}_2$  detectable es de 25 ng/ml.

El análisis por radioinmunoensayo de las fracciones eluidas tras añadir 10, 20, 50, 100 y 200 ng de  $\text{TxB}_2$  por mililitro de orina, muestran una recuperación media del  $76\% \pm 7\%$  (n=5), existiendo una relación lineal entre los valores de  $\text{TxB}_2$  determinados tras extracción y cromatografía y los obtenidos tras extracción únicamente ( $y=0'51 + 1'19 x$ ;  $r = 0'8993$ , n=20).

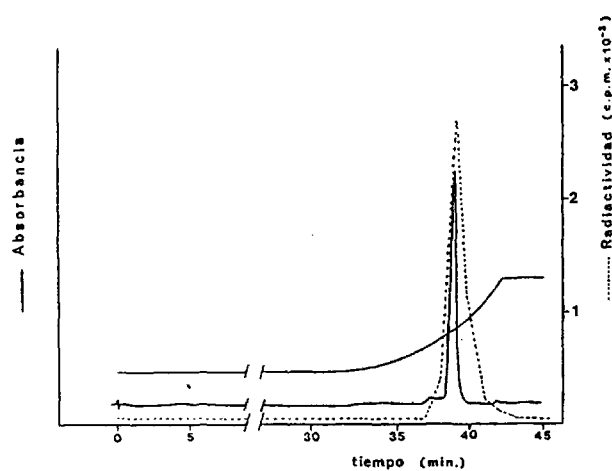


FIGURA 11.- Cromatograma de una disolución acuosa de  $\text{TxB}_2$  y radiocromatograma de  $^3\text{H-TxB}_2$ . Elución isocrática con  $\text{CH}_3\text{-CN: H}_2\text{O}$  (20: 80) durante 30 min. Posterior gradiente cóncavo durante 10 min. hasta  $\text{CH}_3\text{-CN: H}_2\text{O}$  (40: 60). Demás condiciones igual que en FIGURA 10.

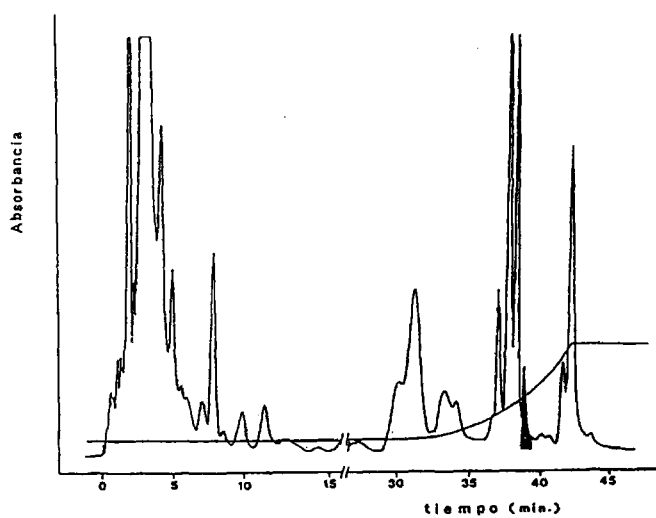


FIGURA 12.- Cromatograma de una muestra urinaria a la que se añadió  $\text{TxB}_2$  exógenamente tras extracción con cloroformo, evaporación y resus-

### 3.3.2.- INFLUENCIA DEL pH URINARIO

Se estudió la variación de los niveles urinarios medidos, para tres concentraciones distintas de  $\text{TxB}_2$  ( $n=10$  en cada nivel) al extraer las muestras a 5 pHs distintos. En la Tabla II se muestran los resultados encontrados. En ella se puede apreciar que no existe una variación significativa en la cantidad de  $\text{TxB}_2$  detectada en el rango de pH comprendido entre 3 y 4. Este hecho hace que el pH pueda ser ajustado tanto con potenciómetro como con tiras reactivas de suficiente precisión.

### 3.3.3.- PRECAUCIONES EN LA MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Tanto el  $\text{TxA}_2$  como el  $\text{TxB}_2$  poseen la propiedad de adherirse inespecíficamente a las superficies de los recipientes que contienen sus disoluciones (118). Para tratar de minimizar este efecto se estudiaron 10 muestras de orina recogidas en probetas de polipropileno de las cuales se almacenaron alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  durante 24 h en tubos de vidrio, polietileno y polipropileno, que son los más empleados habitualmente en los laboratorios. Posteriormente, se analizaron las muestras por radioinmunoensayo tras extracción, utilizando en todo momento material de polipropileno para manejar (puntas de pipetas) y contener (tubos de ensayo) las muestras. En la Figura 13 se

TABLA II.- INFLUENCIA DE LAS VARIACIONES DEL pH

NIVEL	pH	[Tx B <sub>2</sub> ] (ng/ml)		
BAJO	3'00	0'43	C.V. = 7%	} VARIABILIDAD INTRAENSAYO
	3'25	0'44		
	3'50	0'42		
	3'75	0'36		
	4'00	0'41		
MEDIO	3'00	1'00	C.V. = 4%	
	3'25	0'97		
	3'50	1'06		
	3'75	1'00		
	4'00	0'96		
ALTO	3'00	3'20	C.V. = 5%	
	3'25	3'10		
	3'50	3'30		
	3'75	3'30		
	4'00	2'90		

### PERDIDAS POR EL MATERIAL

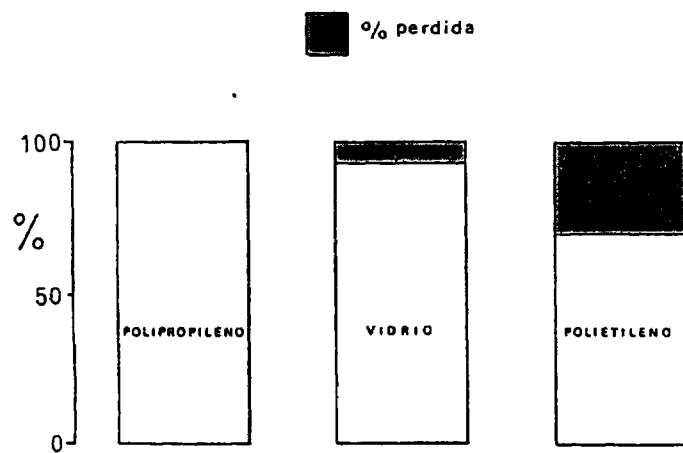


FIGURA 13.- Porcentaje de disminución en los niveles de  $TxB_2$  medidos tras almacenar 10 muestras urinarias en contenedores de vidrio y polietileno durante 24 horas a  $-80^{\circ}C$  respecto de los encontrados tras almacenar las muestras en polipropileno.



puede observar el porcentaje de pérdidas encontradas al almacenar las muestras con los distintos materiales.

Asímismo se ha investigado la influencia del tiempo de almacenamiento, tanto de las muestras como de los extractos reconstituídos en tampón fosfato, sobre los niveles de  $\text{TxB}_2$  que se miden. Para ello se han analizado 10 muestras de orina y sus extractos, tanto en el día de su recogida como a los 3, 15, 30, 90 y 120 días de almacenamiento a  $-80^\circ\text{C}$  en tubos de polipropileno. La Figura 14 muestra que en los extractos existen pérdidas significativas ya a los 15 días de almacenamiento, llegando a ser del 40% a los 4 meses. Sin embargo, en las muestras urinarias sin extraer no se detectan pérdidas hasta después de seis meses de almacenamiento.

#### 3.3.4.- TRATAMIENTO DE LOS BLANCOS

Debido a que la introducción de un proceso previo de purificación podría originar algún tipo de interferencias, se sometieron al proceso extractivo a 10 alícuotas de 1 ml de tampón fosfato con concentraciones conocidas de  $\text{TxB}_2$ , las cuales se ensayaron por radioinmunoensayo al igual que las mismas muestras sin extraer y que los blancos correspondientes a cada punto de la curva de calibrado. Todas ellas mostraron contajes de radiactividad similares que nunca representaron mas de un 5% del valor del máximo de unión. Las muestras urinarias estudiadas se ensayaron asímismo con su blanco correspondiente, no en

PERDIDAS POR ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO ( - 80 °C )

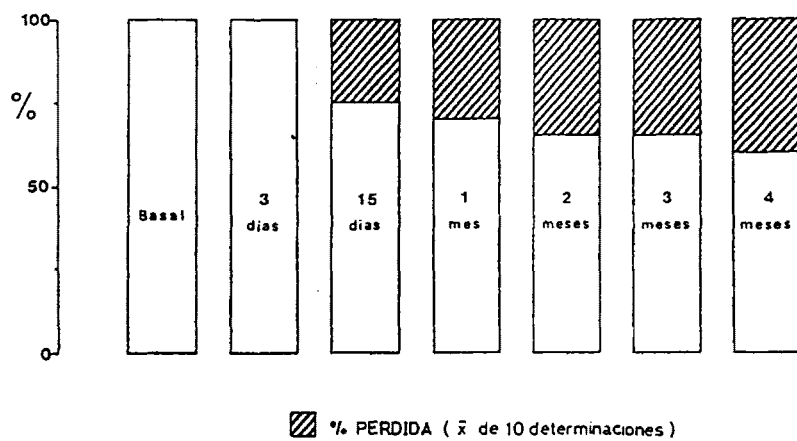


FIGURA 14.- Porcentaje de disminución en los niveles de  $\text{TxB}_2$  medidos tras almacenar el extracto reconstituido en tampón fosfato 50 mM, pH 7.3, en contenedores de polipropileno durante distintos períodos de tiempo.

contrando en estos, contajes de blanco superiores al 6% del máximo de unión.

### 3.3.5.- CÁLCULO DE RESULTADOS

En la Figura 15 se muestra la curva de calibrado que se obtiene al representar la fracción de antígeno marcado ligado respecto de la actividad total ( $\% (B/B_T)$ ), o bien respecto del máximo de unión ( $\% (B/B_0)$ ), frente a la concentración de  $TxB_2$  en papel milimétrico. El valor de  $\% (B/B_0)$  se calcula mediante la expresión:

$$\frac{P - B}{M - B} \times 100, \text{ donde}$$

P = Media de las cuentas del problema o patrón.

B = Media de las cuentas del blanco

M = Media de las cuentas del máximo de unión.

La curva que resulta es de difícil trazado, mostrando una pendiente muy elevada en la zona de concentraciones bajas que dificulta la interpolación en esa zona.

En la Figura 16 se representa la misma curva pero tomando en abscisas una escala logarítmica. Resulta así una curva sigmoide que es ampliamente utilizada pero cuyo trazado puede ser bastante azaroso, no permitiendo, además, una sencilla comparación entre distintas curvas de calibrado. Sin embargo, los puntos de la curva de calibrado se ajustan bien a una recta en el rango de

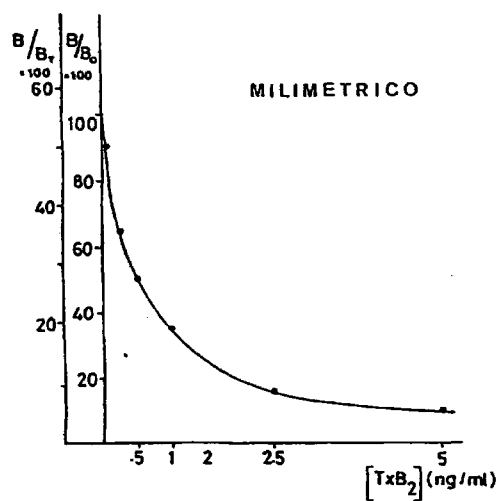


FIGURA 15.- Radioinmunoensayo de TxB<sub>2</sub>. Curva de calibración representada en escala milimétrica.

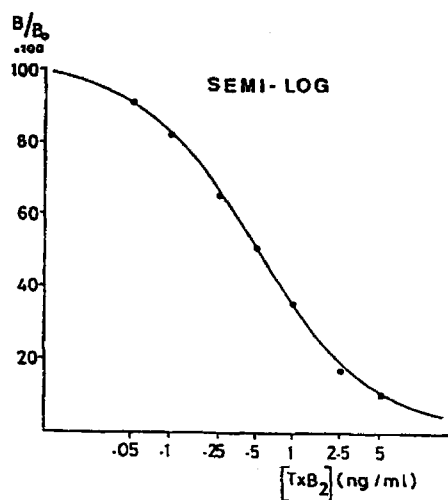


FIGURA 16.- Radioinmunoensayo de TxB<sub>2</sub>. Curva de calibración representada en la escala semilogarítmica.

0'5 a 5 ng/ml (0'14 - 11'36 nmol/l) si se utiliza una representación logit-log (Figura 17). En ella, en ordenadas se representa el logit de  $B/B_0$ , que se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Logit } (B/B_0) = \text{Ln } \frac{(\% B/B_0)}{100 - (\% B/B_0)},$$

y en abscisas el logaritmo de la concentración de antígeno. En la misma Figura se muestran los límites de confianza del 95% intraensayo.

El trazado de esta curva puede realizarse de manera sencilla mediante ajuste por mínimos cuadrados. Para ello se escribió un programa adaptado a una calculadora programable Hewlett-Packard, HP-97, que también puede desarrollarse en los modelos HP-67 y HP-41. Este programa, a partir de los valores del  $\% B/B_0$  de los patrones, suministra la ecuación de la recta en escala logit-log y su coeficiente de correlación, permitiendo realizar en ella, de manera automática, interpolaciones de los valores de la fracción de antígeno marcado ligado para obtener directamente sus concentraciones; o bien, calcular el valor del  $\% B/B_0$  correspondiente a una determinada concentración de antígeno. En la Sección 7 se muestra el listado del programa y la manera de utilizarlo.

### 3.3.6.- FIABILIDAD DE LA TÉCNICA

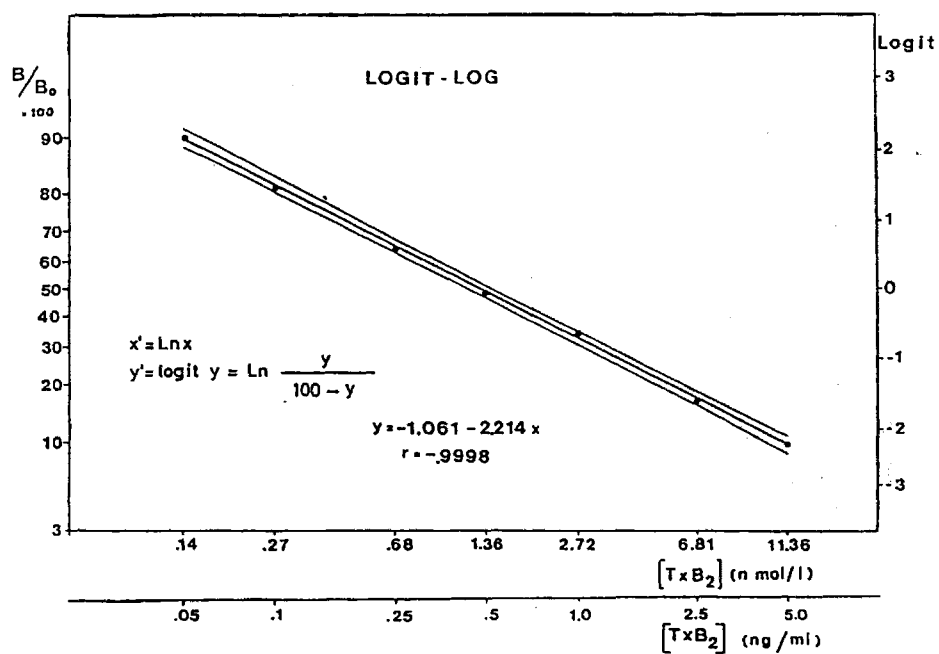


FIGURA 17.- Radioinmunoensayo de  $TxB_2$ . Curva de calibración representada en escala logit-log, mostrando los niveles de confianza del 95% intraensayo.

### 3.3.6.1.- PARALELISMO

La realización de una prueba de paralelismo es un procedimiento útil en el estudio de la presencia de efectos inespecíficos en un radioinmunoensayo y más si las muestras han sido sometidas a un proceso previo de purificación, concentración, etc... (98). Se sometieron tres muestras de orina con valores altos de  $\text{TxB}_2$  a diluciones seriadas al 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. En la Figura 18 se muestra una típica curva de dilución (b) y una de calibrado (a), siendo sus ecuaciones:

Curva de calibrado:  $y = -1'82 - 2'07x$ ;  $r = -0'9984$

Curva de dilución:  $y = -1'22 - 2'14x$ ;  $r = -0'9965$

La realización de una prueba de comparación entre pendientes muestra que no existe diferencia significativa ( $p > 0'95$ ) entre ellas.

### 3.3.6.2.- PRECISIÓN

Se estudió la precisión del método a tres niveles distintos de concentración urinaria de  $\text{TxB}_2$ , tanto intra ensayo como día a día. En ambos casos los resultados se expresan en forma de coeficiente de variabilidad (CV) (Tabla III), según la expresión:

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{DS}}{\bar{x}} \times 100, \text{ donde}$$

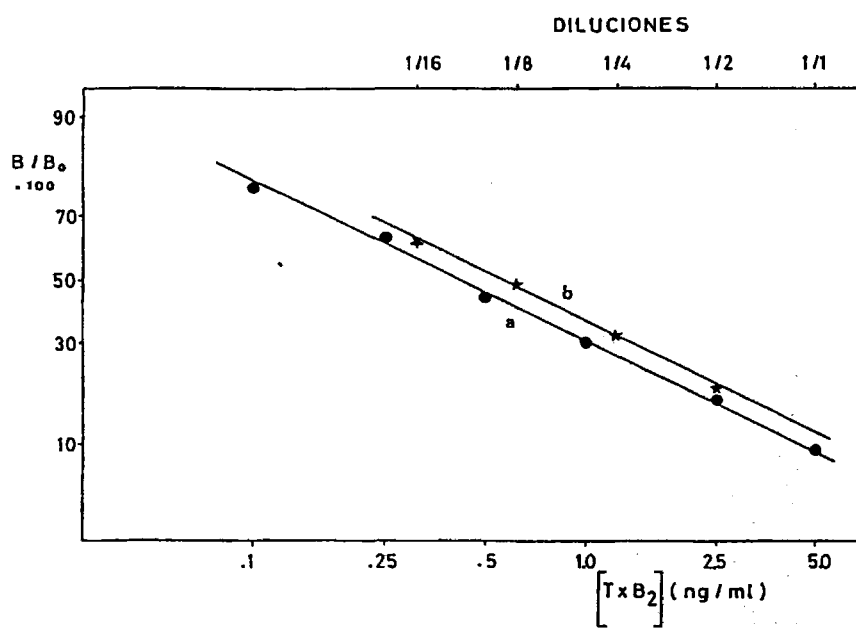


FIGURA 18.- Paralelismo entre los valores de  $TxB_2$  inmunorreactivo contenido en sucesivas diluciones urinarias (b) y una curva de calibrado (a).



TABLA III.- VARIABILIDAD DE LA TÉCNICA DE RADIOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE LOS NIVELES URINARIOS DE TXB<sub>2</sub>.

	<u>n</u>	<u><math>\bar{x}</math> (ng/ml)</u>	<u>DS (ng/ml)</u>	<u>C.V. (%)</u>
INTRAMÉTODO	20	0'20	0'014	7'0
	20	0'70	0'032	4'6
	20	2'15	0'118	5'5
DÍA A DÍA	15	0'30	0'038	12'7
	16	0'85	0'087	10'2
	14	2'04	0'230	11'3

como antes  $\bar{x}$  representa la media de los valores obtenidos a cada nivel y DS su desviación típica.

Todas las muestras se ensayaron por duplicado. La realización del ensayo por triplicado no mejora la reproductibilidad en más del 0'5% a cualquier nivel.

#### 3.3.6.3.- EXACTITUD

Se estudió la exactitud adicionando a una muestra de orina cantidades conocidas y crecientes de  $\text{TxB}_2$  tanto en el rango fisiológico como a niveles superiores e inferiores. En la Figura 19 se representan los valores medidos frente a los calculados teóricamente. El valor de la ordenada en el origen de la recta obtenida coincide con el valor endógeno de  $\text{TxB}_2$  de la muestra urinaria.

Asimismo, debido a que en ocasiones pueden encontrarse valores muy elevados de  $\text{TxB}_2$  en las muestras a ensayar, y sea necesario realizar diluciones de éstas, se estudió el efecto de las diluciones sobre el extracto reconstituido, encontrando que para tres niveles distintos de concentración de  $\text{TxB}_2$ , los resultados obtenidos son proporcionales a las diluciones realizadas (Figura 20).

-50-

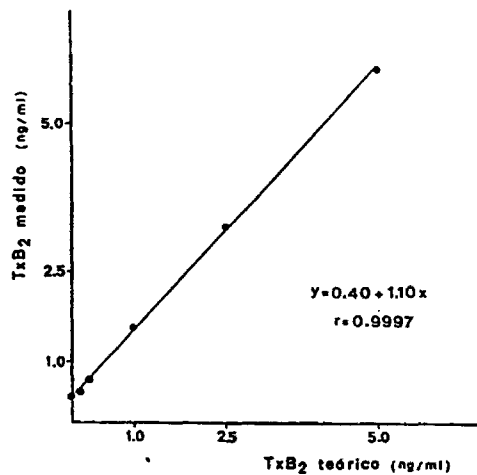


FIGURA 19.- Exactitud del análisis de  $\text{TxB}_2$ , realizado mediante el ensayo de muestras urinarias a las cuales se adicionaron cantidades conocidas y crecientes de  $\text{TxB}_2$ .

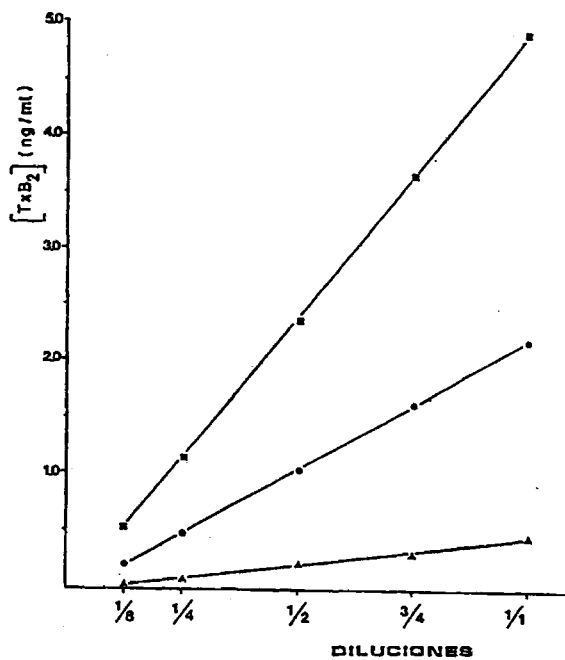


FIGURA 20.- Proporcionalidad entre concentraciones de  $\text{TxB}_2$ , medidas en sucesivas diluciones de los extractos reconstituidos a 3 niveles distintos de concentración del metabolito.

3.3.6.4.- ESPECIFICIDAD E INTERFERENCIAS MEDICAMENTOSAS.

La especificidad del anticuerpo utilizado, calculada a partir de la cantidad de compuesto necesaria para provocar un 50% de desplazamiento del antígeno marcado, aparece en la Tabla IV. Para los compuestos de  $\text{PGA}_2$ ,  $\text{PGB}_2$  y ácidos linoleico, oleico, palmítico y araquidónico, el porcentaje de reacción cruzada es inferior a 0'001 (=50  $\mu\text{g}$  de compuesto).

Se estudió la posible interferencia de diversos fármacos administrados habitualmente a sujetos transplantados. El ensayo de disoluciones acuosas de furosemida, 6-metil-prednisolona, prednisona, azatioprina y tobramicina a las concentraciones urinarias teóricamente mas elevadas posibles, no muestran interferencias con el ensayo. Del mismo modo sucede con la indometacina a las concentraciones utilizadas en la recogida de las orinas.

3.3.6.5.- SENSIBILIDAD.

Generalmente se suelen utilizar dos definiciones distintas para la sensibilidad: una la describe en términos de la pendiente de la curva de dosis-respuesta; esto es, el cambio en la respuesta para un cambio dado en la dosis; la otra, se refiere a la menor cantidad de sustancia (antígeno sin marcar) que puede distinguirse de la ausencia de antígeno con precisión aceptable (mínimo detectable). En el análisis de prostaglandinas, ésta últi

TABLA IV.- ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO UTILIZADO EN LA  
DETERMINACIÓN DE NIVELES URINARIOS DE  $\text{TxB}_2$ .

<u>COMPUESTO</u>	<u>% DE REACTIVIDAD CRUZADA</u>
$\text{TxB}_2$	100
$\text{PGD}_2$	2'0
$\text{PGE}_2$	0'1
$\text{PGF}_2$	0'1
6-ceto-PGF <sub>1</sub>	0'08
$\text{PGA}_2$	0'005

ma es la acepción mas empleada (100, 119). En la practica, se considera que esta cantidad de antígeno es la que provoca un 10% de desplazamiento del máximo de unión; la cual, en el radioinmunoensayo utilizado, ha resultado ser de 50 pg/ml (0'14 nmol/l) de  $\text{TxB}_2$ .

La avidez del anticuerpo es de  $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  y la capacidad media de unión del antígeno al anticuerpo del  $45\% \pm 2\%$  (n=20), siendo la cantidad de  $\text{TxB}_2$  capaz de provocar un 50% de desplazamiento del antígeno marcado, de 0'52 ng/ml (1'41 nmol/l).

### 3.3.7.- INFLUENCIA DE LOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN.

El período de incubación con el anticuerpo no resultó ser determinante de los resultados obtenidos entre 18 y 24 horas (Figura 21).

En la Tabla V se muestra la influencia del tiempo de incubación de los tubos con la suspensión de carbón y dextrano. Este tiempo influye mucho más sobre los resultados finales obtenidos que el de la incubación de la mezcla de reacción.

### 3.3.8.- PRESENCIA URINARIA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.

Debido a que la hematuria es relativamente frecuente en el postransplante inmediato, se investigó la influencia de cé-

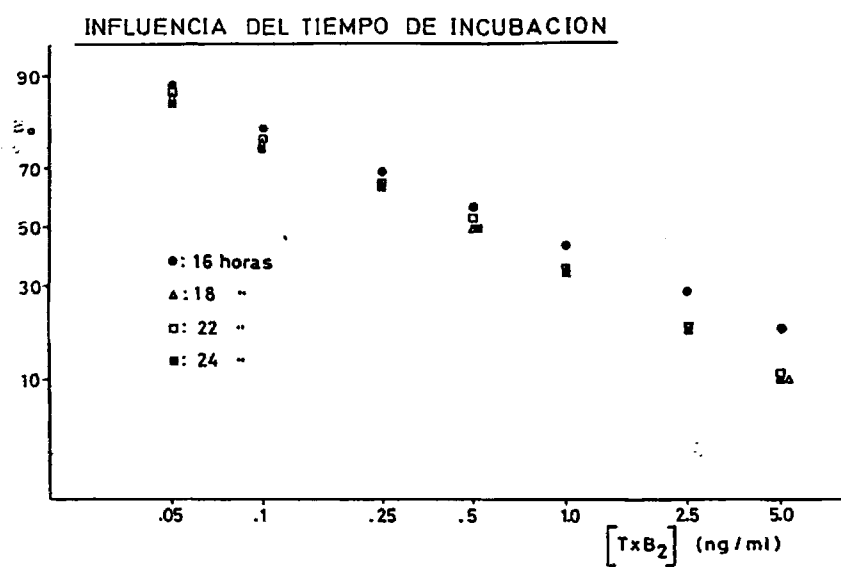


FIGURA 21.- Puntos de las curvas de calibrado obtenidas a distintos tiempos de incubación de la mezcla de reacción.

TABLA V.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN CON LA SUSPENSIÓN DE CARBÓN Y DEXTRANO SOBRE LOS NIVELES DE  $TxB_2$ .

<u>TIEMPO DE INCUBACIÓN</u> <u>(minutos)</u>	<u>DISMINUCIÓN DE LA RADIOACTIVIDAD</u> <u>DE LA FRACCIÓN UNIDA (%)</u>
5	35
10	8
15	-
20	10
25	28



culas sanguíneas bien conservadas (hematíes, leucocitos y plaquetas) y de estas mismas pero lisadas (hemolizado) sobre la determinación en orina de los niveles de  $\text{TxB}_2$ . Para ello se adicionaron distintas cantidades de células y de hemolizado a muestras urinarias que contenían  $0.23 \text{ ng/ml}$  ( $0.62 \text{ nmol/l}$ ) de  $\text{TxB}_2$  endógeno. Una alícuota de cada grupo se extrajo tras incubarla 24 horas con las células en presencia de indometacina  $5.10^{-5} \text{ M}$  y otra en ausencia de esta, a  $22^\circ\text{C}$ . El porcentaje de incremento en los niveles de  $\text{TxB}_2$  respecto de los basales se determinó mediante la expresión:

$$\% \text{ de incremento} = \frac{x-c}{c} \times 100, \text{ donde}$$

$x$  es la concentración final de  $\text{TxB}_2$  encontrada en las orinas y  $c$  la concentración endógena inicial de las mismas.

La extracción y ensayo de las orinas tras 24 horas de incubación con las células o hemolizado sin indometacina conduce a una elevación en las concentraciones de  $\text{TxB}_2$  que es mucho mas importante en el caso de las células no lisadas (Tabla VI). Sin embargo, la incubación en presencia de indometacina reduce drásticamente la generación exógena de  $\text{TxB}_2$  (Tabla VII).

### 3.3.9.- VALORES NORMALES

Con el fin de establecer un intervalo de referencia de los valores urinarios de  $\text{TxB}_2$ , se estudiaron sus niveles en la orina de 24 horas de 12 sujetos (9 varones y 3 mujeres) de edades comprendidas entre 16 y 40 años, recogidas según el método expuesto

TABLA VI.- EFFECTO DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS LISADAS Y NO LISADAS TRAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN CON LAS ORINAS SIN INDOMETACINA.

	<u>% EN ORINA</u>	<u>% ELEVACIÓN</u>
	0'8	-
	1'0	-
CÉLULAS LISADAS	1'7	39
	8'3	78
	12'5	378
	0'8	-
	1'0	-
CÉLULAS NO LISADAS	1'7	156
	8'3	572
	12'5	2.488

TABLA VII.- EFFECTOS DE LAS CÉLULAS LISADAS Y NO LISADAS TRAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN CON LAS ORINAS EN PRESENCIA DE INDOMETACINA  $5.10^{-5}$  M.

	<u>% EN ORINA</u>	<u>% ELEVACIÓN</u>
	2'5	21
CÉLULAS LISADAS	12'5	21
	25	21
	2'5	29
CÉLULAS NO LISADAS	12'5	31
	25	43

en 3.2.1. Ninguno de estos sujetos tomó inhibidores de la ciclo-oxigenasa durante, al menos, una semana antes de la recolección de las orinas. Los valores encontrados fueron:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 0'47 && \text{ng/ml (1'27 nmol/l)} \\ \text{DS} &= 0'120 && " \quad (0'32 \quad " \quad ) \\ \bar{x} \pm 2\text{DS} &= 0'23-0'71 && \text{ng/ml (0'62-1'92 nmol/l)} \\ \text{Rango: } &0'32-0'74 && " \quad (0'87-2'01 \text{ nmol/l})\end{aligned}$$

También se estudiaron los valores normales del cociente  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  urinarios encontrando en la misma muestra de individuos los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 0'35 && \text{ng/mg} \\ \text{DS} &= 0'130 && " \\ \bar{x} \pm 2\text{DS} &= 0'19 - 0'71 && " \\ \text{Rango: } &0'21 - 0'64 && "\end{aligned}$$

### 3.3.10.- INFLUENCIA DE LA CIRUGÍA

Todos los sujetos transplantados son sometidos a un proceso quirúrgico que conlleva una activación de la coagulación sanguínea y un aumento en la síntesis de  $\text{TxA}_2$ . Por ello se estudiaron los niveles urinarios de  $\text{TxB}_2$  durante los tres primeros días de evolución postquirúrgica en 5 sujetos sometidos a cirugía (laparotomía exploratoria) no complicada, encontrando una elevación significativa en el día 2 desde valores de  $0'61 \pm 0'50$  ng/ml

a  $1'05 \pm 0'44$  ng/ml ( $p < 0'05$ , prueba de Wilcoxon de la escala de clasificación con signo), retornando posteriormente los niveles de  $\text{TxB}_2$  a valores basales ( $0'41 \pm 0'21$  ng/ml).

### 3.4.- DISCUSION

El radioinmunoensayo es un método adecuado para la determinación seriada de los niveles urinarios de  $\text{TxB}_2$  cuando es necesario realizar un elevado número de determinaciones en un período relativamente corto de tiempo y con fiabilidad. El radioinmunoensayo proporciona un método rápido, de costo no excesivo (ya que no necesita un equipamiento caro o complejo) y que al mismo tiempo es sensible y específico. Por otra parte, la utilización de muestras urinarias hace que el método no sea en absoluto agresivo.

En nuestra experiencia, no es posible realizar el análisis directamente sobre las muestras de orina debido a la presencia de interferencias inespecíficas de bajo peso molecular, las cuales afectan a la adsorción del exceso de antígeno marcado sobre el carbón revestido de dextrano. Este hecho puede estar acompañado, en menor proporción, de la unión de las sustancias interferientes a los sitios específicos para el antígeno que posee el anticuerpo, con lo que quedaría aún más antígeno libre marcado en la mezcla de reacción sin poderse unir al carbón. Por ello se hace necesario un proceso previo de purificación, que ha de ser eficaz, sencillo, de rápida realización para disminuir los tiempos de análisis y que afecte lo menos posible a la fiabilidad global del proceso. De esta manera se estudiaron la extracción con disolventes orgánicos y la extracción seguida de cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa.

En la extracción orgánica, el cloroformo resulta más efectivo que el acetato de etilo, proporcionando una mayor reproducibi-

lidad en el proceso. Debido a que las muestras utilizadas son de orina, no se hace necesario realizar una extracción previa con hexano a pH=7 para eliminar los lípidos neutros, lo que es necesario llevar a cabo con la mayoría de las muestras plasmáticas (102). Así, se evita la manipulación excesiva de las muestras con la consiguiente posibilidad de introducir factores que afecten a la determinación analítica de  $\text{TxB}_2$ . Se han utilizado alícuotas de 1 ml. de orina ya que de esta manera se ha podido realizar la extracción en tubos de polipropileno de 10 ml. Volúmenes menores que hubieran dificultado el manejo de las muestras y habrían podido ser causa de errores. Por el contrario, el empleo de volúmenes mayores no hubiese permitido utilizar este material ni el aparato de evaporación simultánea de extractos con capacidad para 12 muestras. De esta manera el análisis sería considerablemente más lento y tedioso.

El proceso de extracción no alarga significativamente el tiempo de análisis, ya que cada orina se agita durante 30 s. con el cloroformo y la evaporación no consume más de 15-20 minutos a temperatura ambiente. Esta velocidad puede incrementarse introduciendo los tubos en un baño de agua a 35-37°C en caso de ser necesario. Tanto las muestras como los patrones fueron sometidos al proceso extractivo en medio ácido y todos ellos mostraron poseer el mismo pH (7.3) al ser reconstituidas con el tampón fosfato, por lo que no fué necesario lavar los extractos para neutralizar el pH.

La extracción de las orinas con cloroformo no ha presentado problemas de formación de emulsiones salvo en algunos casos de orinas muy hematóricas. En estas, la emulsión se ha eliminado

removiéndola lentamente con una punta de pipeta de polipropileno y centrifugando posteriormente.

Para asegurar la máxima recuperación en la extracción es necesario acidificar las muestras de manera que no existan cargas sobre la molécula de  $\text{TxB}_2$ . Esta acidificación puede controlarse con una simple tira de papel reactivo de suficiente precisión, situando el pH entre 3 y 4. Por encima de  $\text{pH}=4$ , la recuperación tiende a disminuir por la no completa extracción del metabolito, mientras que por debajo de  $\text{pH}=3$  empiezan a tener lugar fenómenos de hidrólisis.

La utilización de un gradiente ligeramente cóncavo en la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa permite realizar la elución del  $\text{TxB}_2$  de manera rápida y completa, obteniéndose un pico simétrico. Habitualmente, el  $\text{TxB}_2$  es el producto derivado de la ciclooxigenasa que peor eluye, presentando unos picos anchos y no siempre simétricos (109, 111-115). Con el gradiente utilizado, la elución se realiza en un pico estrecho y simétrico con lo que es más sencillo aislar la fracción en que se encuentra y se cometen menos errores en su evaluación directa por medio de un integrador. Sin embargo, esto no es suficiente para poder detectar los niveles urinarios habituales que presenta el metabolito. El proceso de concentración que es necesario realizar (aproximadamente  $\times 100$  ó  $1000$ ) hace que aumente excesivamente el tiempo de análisis por muestra. Como técnica purificativa, la CLAE-FR no incide de manera determinante sobre la fiabilidad del análisis y hace la técnica más lenta.

Un aspecto que habitualmente no es considerado es el material que se utiliza en la manipulación de muestras y reactivos. El  $\text{TxB}_2$  tiende a adherirse inespecíficamente a las superficies de los recipientes que contienen sus disoluciones. Esta tendencia es mayor en el vidrio, y, sobre todo, en el polietileno respecto del polipropileno. Por ello, tanto los recipientes de recogida de muestras como las puntas de pipetas y tubos de almacenamiento, extracción y radioinmunoensayo fueron de polipropileno. Los fenómenos de adsorción, degradación, o ambos, que tienen lugar en los extractos almacenados, hicieron que estos se ensayaran siempre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción. Durante ese período no se observaron disminuciones significativas de los niveles de  $\text{TxB}_2$  medidos. Este hecho no se observó, sin embargo, durante el almacenamiento de las muestras urina-rias centrifugadas, quizá por un efecto de "revestimiento" de las paredes de los tubos por parte de otros metabolitos presentes en la orina.

Tanto las muestras como las disoluciones empleadas en la construcción de la curva de calibrado mostraron valores de los blancos bajos, constantes y reproducibles, siendo siempre menores que el límite práctico de utilización del método (ningún blanco representó más del 10% del máximo de unión). Durante la extracción, la eliminación de interferencias es eficaz como lo muestran los ensayos de paralelismo y exactitud. La reproducibilidad del método, tanto intraensayo como día a día se encuentra en el rango habitual de las técnicas de radioinmunoensayo. El anticuerpo utilizado es específico y los fármacos en-



sayados no interfieren con el proceso analítico. Estos son los que se administran tanto durante la terapia inmunosupresora basal como en las crisis de rechazo o en presencia de infección. El procedimiento analítico presenta una elevada sensibilidad, tanto en el sentido de poseer un bajo de mínimo detectable ( $0.05 \text{ ng/ml}$ ) como en el de pendiente de la curva de dosis-respuesta que es tal, que en el intervalo de concentraciones de  $0.25$  a  $1 \text{ ng/ml}$  es capaz de detectar diferencias de  $0.02 \text{ ng/ml}$  estando en esta zona el rango de los valores encontrados en las orinas de 24 horas de los sujetos sanos. Asimismo, los extractos pueden diluirse, encontrando resultados proporcionales a la dilución realizada en un amplio rango de concentraciones.

Para realizar el cálculo de resultados se eligió la representación logit-log no ponderada (120) la cual, evita los inconvenientes de la utilización de las representaciones en papel milimétrico (dificultad de interpolación a valores altos de  $\% B/B_0$ ) o semilogarítmico (trazado arbitrario). Con el método utilizado, cuando un punto se desvió muy significativamente de los demás, no fué introducido en el cálculo de regresión. Sin embargo, pequeñas o moderadas desviaciones de algún punto no condujeron a la obtención de resultados sustancialmente distintos de concentración de  $\text{Tx}B_2$  o del valor de la pendiente de la recta. El empleo de un calculador programable hace que se evite la introducción de juicios subjetivos, tanto en el trazado de la curva patrón, como en el de las interpolaciones realizadas sobre ella. El método utilizado ha sido comparado con otros más complejos que necesitan un soporte material mucho

más sofisticado para su realización, no encontrado diferencias importantes respecto de ellos (121).

El tiempo de incubación de los antígenos con el anticuerpo no es determinante de los resultados obtenidos en un margen de ± 2 horas alrededor de las 20 de incubación. Sin embargo, tiempos menores conllevan un alejamiento de las condiciones de equilibrio del sistema con la consiguiente disminución en la reproductibilidad de los resultados. Esta incubación se realizó a 4°C con el fin de aumentar la energía de la reacción antígeno-anticuerpo, disminuir la actividad de posibles enzimas degradantes y aumentar la sensibilidad del ensayo.

Más determinante es el tiempo de incubación con la suspensión de carbón y dextrano. Pequeñas variaciones por debajo de los 15 minutos implican una no completa adsorción de los antígenos libres sobre el carbón, mientras que, a tiempos superiores, empieza a absorberse el antígeno de los complejos, lo cual origina una alteración del equilibrio antígeno-anticuerpo y, por tanto, un falseamiento de los resultados. Por ello, es importante que el tiempo que permanece la suspensión en todos los tubos sea esencialmente el mismo y de 15 minutos. En la práctica esto se consigue fácilmente no ensayando más de 100 tubos simultaneamente.

La presencia de células sanguíneas en la orina, durante el tiempo de recogida de las muestras hace que se encuentren valores de  $TxB_2$  muy elevados en las mismas, que aumentan con la cantidad de aquéllas o, en menor proporción, de hemolizado. Por ello, es imprescindible realizar la recogida de las orinas sobre

indometacina a la concentración de  $5.10^{-5}$  M mostrándose ésta útil para prevenir la generación exógena de  $TxB_2$ . De esta manera, disminuye la influencia de la hematuria, en el postoperatorio inmediato, sobre los niveles medidos del metabolito.

Un factor que es necesario también tener en cuenta en las primeras horas del postransplante es la elevación de los niveles de  $TxB_2$  como consecuencia del proceso quirúrgico. En nuestra experiencia, existe un aumento significativo de éstos el día 2 de evolución tras cirugía exploratoria. Este aumento se debe presumiblemente a  $TxB_2$  de origen extrarrenal que se ha formado durante la activación plaquetaria y de otras células en los procesos de coagulación post-quirúrgicos.

En resumen, la técnica estudiada para la determinación de los niveles urinarios del  $TxB_2$  es de sencilla ejecución, con un proceso previo de purificación mediante extracción orgánica que no alarga considerablemente el tiempo de análisis, fiable y suficientemente sensible para permitir el seguimiento día a día de éste metabolito en sujetos transplantados, teniendo en cuenta la necesidad de una correcta recolección de las muestras y la influencia del propio proceso quirúrgico.

#### 4.- TxB<sub>2</sub> EN TRANSPLANTE RENAL HUMANO

##### 4.1.- PACIENTES Y MÉTODOS

###### 4.1.1.- ENFERMOS

Se estudiaron 45 enfermos transplantados, 43 de cadáver y 2 de donante vivo, 35 varones y 10 mujeres, con edades comprendidas entre 14 y 56 años ( $35,8 \pm 9,9$ ). El período evolutivo estudiado comprende desde el día del transplante hasta el alta del Hospital, nefrectomía o exitus, con un promedio de  $21,7 \pm 10,9$  días y un rango de 3-65 días.

###### 4.1.2.- INMUNOSUPRESIÓN

En todos los casos se realizó inmunosupresión convencional con esteroides (prednisona y 6-metil prednisolona) y azatioprina.

Durante las primeras 48-72 horas se administró 6-metil prednisolona intravenosa (40 mg/12 horas). Una vez lograda la tolerancia digestiva, se comenzó con prednisona oral a la dosis de 80 mg/día en 2 tomas. En los enfermos sin episodios clínicos de rechazo agudo, la prednisona oral se redujo has

ta alcanzar los 20 mg/día al finalizar el tercer mes y la dosis de mantenimiento de 10 mg/día al comienzo del segundo año.

La dosis de azatioprina osciló entre 100 y 150 mg/día según peso y tolerancia hematológica. Esta dosis se mantuvo de manera continua excepto en los casos de aparición de efectos secundarios (principalmente leucopenia).

Los episodios de rechazo agudo fueron tratados con 6-metil prednisolona intravenosa (250 mg diarios hasta alcanzar una dosis de 2-4 g. por episodio de rechazo agudo), manteniéndose la dosis previa de prednisona oral hasta que la función renal se estabilizó. Ninguno de los sujetos recibió irradiación local del injerto.

#### 4.1.3.- DIAGNÓSTICO DE NECROSIS TUBULAR AGUDA (NTA)

Esta situación es definida como función renal inmediata insuficiente, con ascenso postoperatorio de los productos nitrogenados en sangre y necesidad de diálisis, exclusión de otras causas, patrón bioquímico urinaria sugestivo (principalmente concentración urinaria de  $\text{Na}^+$  superior a 20-25 mEq/l (20-25 mmol/l)) y cociente de osmolalidades entre orina y plasma de 1,2 ó menor y evolución espontanea hacia la recuperación funcional.

#### 4.1.4. DIAGNÓSTICO DE RECHAZO

Se han estudiado 34 episodios de rechazo agudo con determinaciones seriadas de  $\text{TxB}_2$  en orina, habiéndose confirmado el diagnóstico de rechazo en el análisis retrospectivo realizado. Todos los casos disponen de registro adecuado de síntomas, peso, temperatura y tensión arterial. El estudio analítico incluyó, entre otras, las determinaciones diarias de creatinina, urea, sodio en orina, excrección fraccional de sodio, proteinuria y hematuria. Todos los casos excepto uno disponen de estudio ecosonográfico seriado; 15 casos de renograma con  $^{99}\text{Tc-DTPA}$  y sólo en uno se hizo arteriografía. (Figuras 22 y 23). En el análisis retrospectivo se ha valorado la evolución clínica y, especialmente, la respuesta al tratamiento anti-rechazo. Así, 28 de 34 crisis de rechazo respondieron al intensificar la inmunosupresión y en los 6 restantes se dispone de confirmación histológica.

Para analizar los resultados se han distinguido cuatro situaciones clínicas diferentes:

GRUPO A.- Transplante no complicado, sin NTA ni rechazo.

Está constituido por 10 sujetos con buena función renal inmediata y persistente que no recibieron tratamiento anti-rechazo. La creatinina sérica en el momento del alta era de  $1,5 \pm 0,36$  mg/dl ( $132'6 \pm 31'82$   $\mu\text{mol/l}$ ).

DIAGNOSTICO DE RECHAZO SOBRE RIÑON FUNCIONANTE

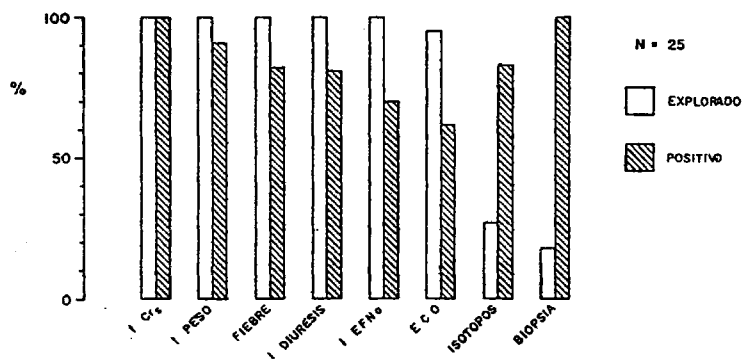


FIGURA 22.- Porcentaje de parámetros explorados y de enfermos en que se alteran estos en el diagnóstico de rechazo sobre injerto funcionando.  
EfNa: Excrección fraccional de sodio. ECO: Ecografía.

DIAGNOSTICO DE RECHAZO SOBRE NTA

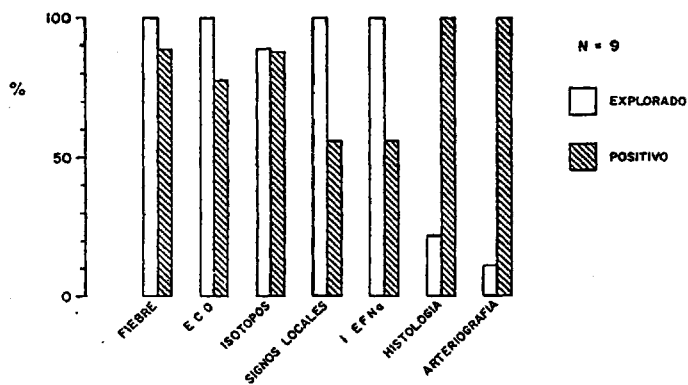


FIGURA 23.- Porcentaje de parámetros explorados y de enfermos en que se alteran éstos en el diagnóstico de rechazo sobre NTA.

GRUPO B.- Rechazo sobre injerto funcionante.

Este grupo está constituido por 25 observaciones. Como promedio el rechazo apareció el día  $9,4 \pm 8,7$  de evolución postransplante. Sólo 4 casos no respondieron al tratamiento anti-rechazo y en todos ellos el diagnóstico se confirmó histológicamente. La creatinina al alta de los casos con buena evolución fué de  $1,6 \pm 0,46$  mg/dl ( $141'4 \pm 40,66$   $\mu$ mol/l).

GRUPO C.- NTA postoperatoria sin rechazo.

Se ha observado en 5 ocasiones. Cuatro casos cursaron con oliguria. La creatinina sérica alcanzada al superar la NTA fue de  $1,73 \pm 0,33$  mg/dl ( $152'9 \pm 29'17$   $\mu$ mol/l).

GRUPO D.- Rechazo sobre NTA.

El diagnóstico de rechazo se estableció el día  $5 \pm 2$  de postoperatorio con un rango de 2-8 días. Respondieron al tratamiento anti-rechazo 7 de los 9 casos; en los otros dos el diagnóstico se confirmó histológicamente. La creatinina al alta de los que respondieron fué de  $1,6 \pm 0,60$  mg/dl ( $141'4 \pm 53'04$   $\mu$ mol/l).

Un enfermo sufrió 2 episodios de rechazo agudo sobre riñón funcionante. Otros 3 enfermos, que cursaron con NTA inicial, padecieron rechazo una vez recuperada la función. Por ello, se analizaron un total de 49 situaciones o circunstancias clínicas en 45 enfermos.

En resumen, un 31% de los enfermos padecieron NTA, la



incidencia de rechazo durante el período estudiado fué de 0,75 crisis/enfermo (80% de los enfermos con riñón funcional y 64% de los que tuvieron NTA) y el 82% de las crisis de rechazo respondieron al intensificar la inmunosupresión.

#### 4.1.5.- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras sanguíneas se recogieron en tubos heparinizados, centrifugados posteriormente a 1000 g. durante 10 minutos a temperatura ambiente, utilizándose el plasma así obtenido para determinar las concentraciones de sodio, potasio, urea, creatinina y otros parámetros complementarios (calcio, fósforo, ácido úrico, glucosa, osmolalidad).

Las muestras urinarias se recogieron durante períodos de 24 horas sobre indometacina ( $5 \cdot 10^{-5}$  M) a temperatura ambiente. Tras medir su volumen se centrifugaron alícuotas de 10 ml a 1000 g. durante 10 minutos y temperatura ambiente. Con el sobrenadante se realizaron determinaciones de tromboxano  $B_2$ , sodio, potasio, urea, creatinina, fósforo, calcio y glucosa. Se comprobó la ausencia de interferencias de la indometacina a concentraciones de hasta 25 mM con los métodos analíticos utilizados en el análisis de los demás parámetros bioquímicos. Para analizar el sedimento urinario se utilizaron muestras de orina pertenecientes a una micción reciente. Diez mililitros de esta muestra se centrifugaron a 400 g. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras desechar el sobrenadante, se sometió al precipitado a análisis microscópico sin utilizar ningún método de tinción.

#### 4.1.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.1.6.1.- DETERMINACIÓN DE $\text{TxB}_2$

La concentración urinaria de  $\text{TxB}_2$  se determinó por radioinmunoensayo tras extracción de las orinas con disolventes orgánicos según se expuso en la Sección 3.

##### 4.1.6.2.- DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CREATININA

Los niveles de este metabolito se determinaron espectrofotométricamente según el método de Jaffé modificado (122), en un Autoanalizador ASTRA 8 (Beckman), midiendo con ácido pícrico en medio básico. Esta reacción tiene una constante de velocidad de primer orden que es función de la concentración de NaOH presente en el medio.

El rango normal de los valores de éste parámetro es de  $1.0 \pm 0.10$  mg/dl ( $85.7 \pm 8.84$   $\mu\text{mol/l}$ ) para hombres y de  $0.7 \pm 0.10$  mg/dl ( $61.9 \pm 8.84$   $\mu\text{mol/l}$ ) para mujeres.

##### 4.1.6.3.- DETERMINACIÓN DE SODIO Y POTASIO

Los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en plasma y orina se midieron potenciometricamente en un Autoanalizador ASTRA 8 por medio de electrodos selectivos para estos iones. El rango de normalidad para  $\text{Na}^+$  es de  $141 \pm 3.0$  mEq/l ( $141 \pm 3.0$  mmol/l) y de  $4 \pm 0.3$  mEq/l ( $4 \pm 0.3$  mmol/l) para  $\text{K}^+$  (123).

#### 4.1.7.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

El estudio de los valores de los parámetros utilizados y la comparación entre los distintos grupos se realizó mediante análisis de la varianza, y pruebas de Wilcoxon en el caso de muestras de pequeño tamaño ( $n \leq 15$ ). El análisis de la varianza y de regresión se llevó a cabo con un calculador programable HP-97 (124) y un programa escrito en Pascal para un mini-ordenador Digital (125).

El análisis de la utilidad diagnóstica de los valores de  $TxB_2$  y de  $TxB_2/Cr$ , cuando se utilizan junto con los parámetros diagnósticos habituales de rechazo y necrosis tubular aguda, se realizó mediante la aplicación iterativa del teorema de Bayes (126).

#### 4.2.- RESULTADOS

Se estudió la evolución post-transplante de los valores de la concentración de  $TxB_2$  y del cociente de  $TxB_2/Cr$  urinarios junto con los demás parámetros utilizados en el seguimiento del enfermo transplantado, entre los cuales, además de los utilizados en el diagnóstico de rechazo, se encuentran hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de leucocitos y plaquetas, pruebas de función hepática, estudios virológicos y anticuerpos citotóxicos.

Los valores de la excrección urinaria de  $TxB_2$  (cantidad de  $TxB_2$  excretada en orina por unidad de tiempo-24 horas-) mos-

traron poseer una elevada correlación con los de la correspondiente concentración de  $\text{TxB}_2$  ( $r=0'7606$ ,  $p<0'001$ ;  $n=601$ ). Sin embargo, en diuresis inferiores a 500 ml/24 horas desaparece esta correlación ( $r=0'0325$ ;  $n=104$ ).

No se encontró correlación entre los valores de pH y concentración de  $\text{TxB}_2$  ( $r=0'2104$ ) o entre pH y excrección de  $\text{TxB}_2$  ( $r=0'2108$ ). Asimismo no se encontró correlación entre volumen y concentración de  $\text{TxB}_2$  urinarios ( $r=0'2368$ ).

#### 4.2.1.- GRUPO A: TRANSPLANTE NO COMPLICADO

Los sujetos de éste grupo evolucionaron hacia una rápida normalización de la función renal reflejada por la disminución de los niveles de creatinina plasmática según se muestra en la Figura 24 en la cual se representa el comportamiento global de la diuresis y de los niveles de creatinina,  $\text{TxB}_2$  y  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$ . Estos dos últimos se mantienen uniformemente bajos y estables durante la evolución postransplante, al tiempo que se mantienen elevadas diuresis.

En los dos primeros días de evolución se observa una ligera elevación de  $\text{TxB}_2$  y  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$ , la cual se asocia a la influencia de la cirugía y revierte rápidamente normalizándose ambos parámetros a partir del tercer día de postoperatorio ( $p<0'05$ ).

En dos enfermos se aprecia una elevación del  $\text{TxB}_2$  no atribuible a rechazo. El primero de ellos presentó una elevación leve, únicamente del cociente, los días 9 y 10 de post-

Tx B<sub>2</sub> EN TR NO COMPLICADO

N = 10

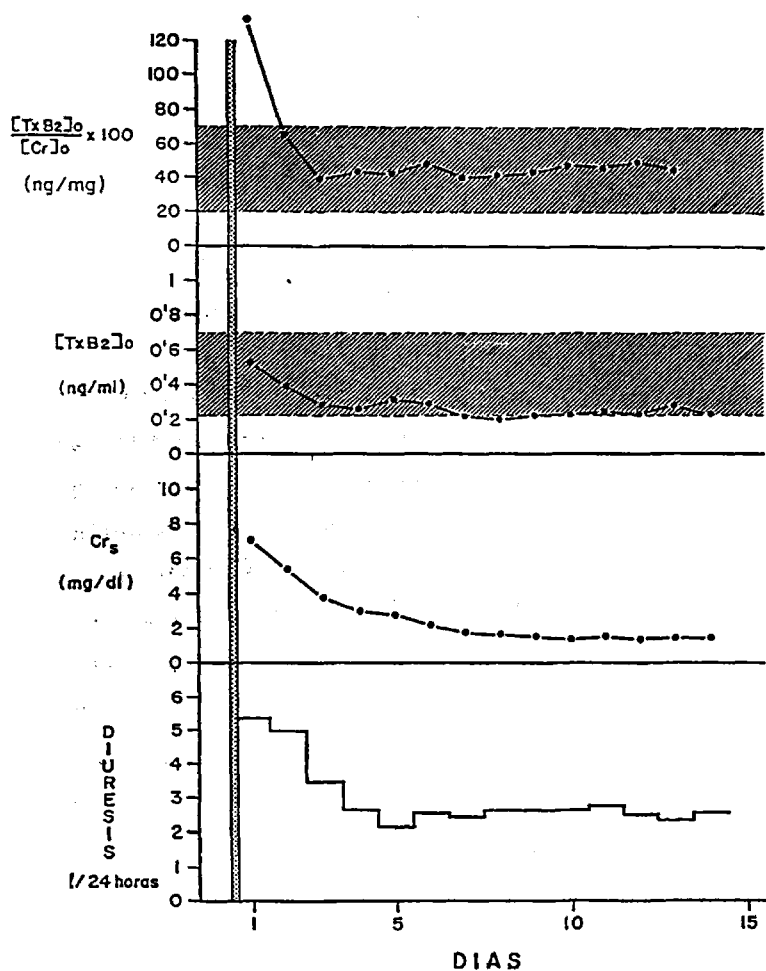


FIGURA 24.- Evolución media de  $TxB_2/Cr$  y  $TxB_2$  urinarios, creatinina sérica y volumen de diuresis en transplante renal no complicado.

operatorio sin otro dato clínico que febrícula; la evolución fué excelente sin tratamiento antirrechazo ni empleo de antibióticos.

El otro enfermo presentó un cuadro agudo en el inmediato postoperatorio, de hipotensión y anemia intensa; mediante ecosonografía se detectó un gran hematoma perirrenal. La reintervención demostró un escape a nivel de la sutura arterial. Durante una semana se obtuvo drenaje hamático de la celda y presentó hematuria con coágulos. El cociente  $TxB_2/Cr$  se mantuvo elevado durante las 2 primeras semanas de evolución; la concentración de  $TxB_2$  solo se elevó los días 12 y 13. Por tanto, se trata de un falso positivo por hematoma perirrenal y hematuria macroscópica.

#### 4.2.2.- GRUPO B: RECHAZO SOBRE INJERTO PREVIAMENTE FUNCIONANTE.

Diecinueve de los 25 episodios (76%) cursaron con elevación del  $TxB_2$ , que fué previa al diagnóstico clínico del rechazo y al incremento de la creatinina, con una antelación promedio de 48 horas ( $p < 0.01$ , Figura 25). El cociente  $TxB_2/Cr$  se afectó más precozmente que la concentración de  $TxB_2$ , elevándose significativamente ( $p < 0.02$ ) cuatro días antes del diagnóstico. El tratamiento del rechazo con 6-metil prednisolona intravenosa normalizó inmediatamente la concentración de  $TxB_2$  pero se apreciaron ligeras elevaciones del cociente  $TxB_2/Cr$  algunos días durante los 10 primeros de evolución

TxB<sub>2</sub> EN RECHAZO SOBRE INJERTO FUNCIONANTE

N = 25

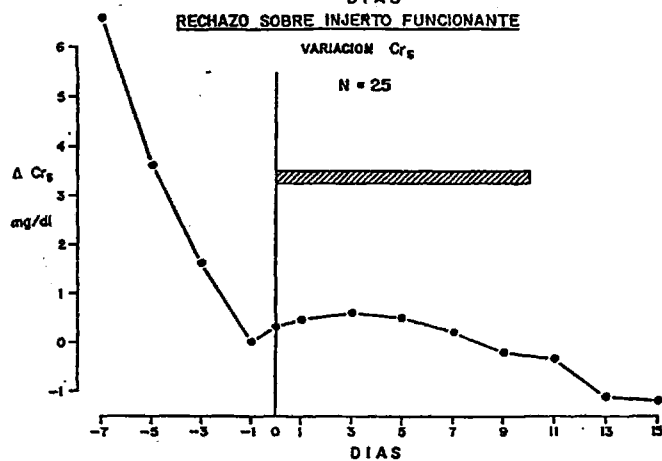
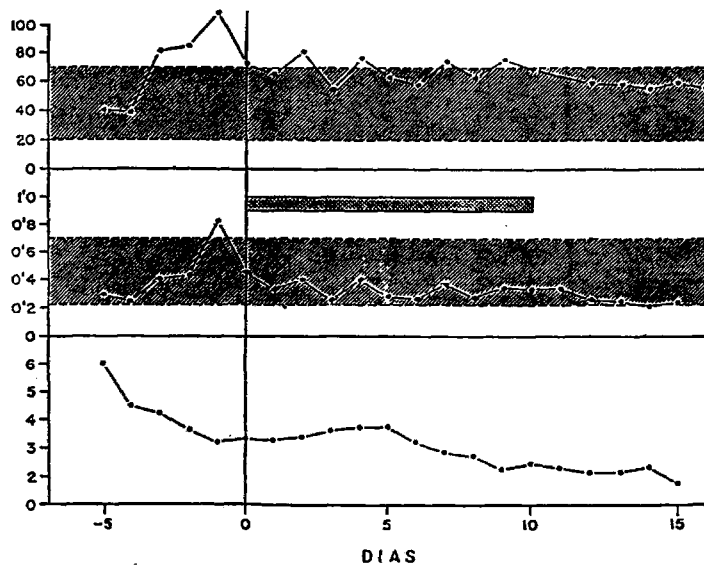


FIGURA 25.- Evolución media de TxB<sub>2</sub>/Cr y TxB<sub>2</sub> urinarios, creatinina sérica e incremento de creatinina en rechazo sobre transplante funcionante. El día 0 representa el día del diagnóstico clínico del rechazo; la barra horizontal, el tratamiento inmunosupresor.

del rechazo. Con el control de la crisis ambos parámetros se normalizan de manera persistente. La suspensión de las dosis de los valores de 6-metilprednisolona ocasiona en 5 casos una elevación de los valores de  $\text{TxB}_2$  y  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  (fenómeno de rebote) sin paralelismo en los niveles séricos de creatinina.

La Figura 26 muestra la evolución típica de un sujeto de éste grupo. En este caso, los niveles de  $\text{TxB}_2$  se elevan 72 y 24 horas antes del diagnóstico clínico del rechazo, mientras que los valores de  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  siguen una evolución similar aunque continuamente elevados. En éste momento evolutivo, la creatinina estaba disminuyendo y la diuresis se normalizaba tras la fase poliúrica inicial. La resolución del proceso de rechazo exigió la administración de 8 dosis intravenosas de 6-metilprednisolona. Al comenzar éste tratamiento los valores de  $\text{TxB}_2$  y  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  se normalizaron rápidamente, mejorando paulatinamente la función renal. La suspensión de la terapia esteroidea ocasiona un ligero efecto rebote que no tuvo repercusión clínica.

En 6 crisis de rechazo (24%) el  $\text{TxB}_2$  urinario no se elevó (falsos negativos). En 5 ocasiones se trató de rechazos leves que en ningún momento supusieron elevaciones de los valores de creatinina plasmática de más de 1 mg/dl (88,4  $\mu\text{mol/l}$ ); en el otro caso, la elevación de éste parámetro fué de 3,7 mg/dl (327  $\mu\text{mol/l}$ ). Todos fueron tratados y respondieron con facilidad y rapidez (máxima dosis de 6-metilprednisolona empleada: 4.250 mg).



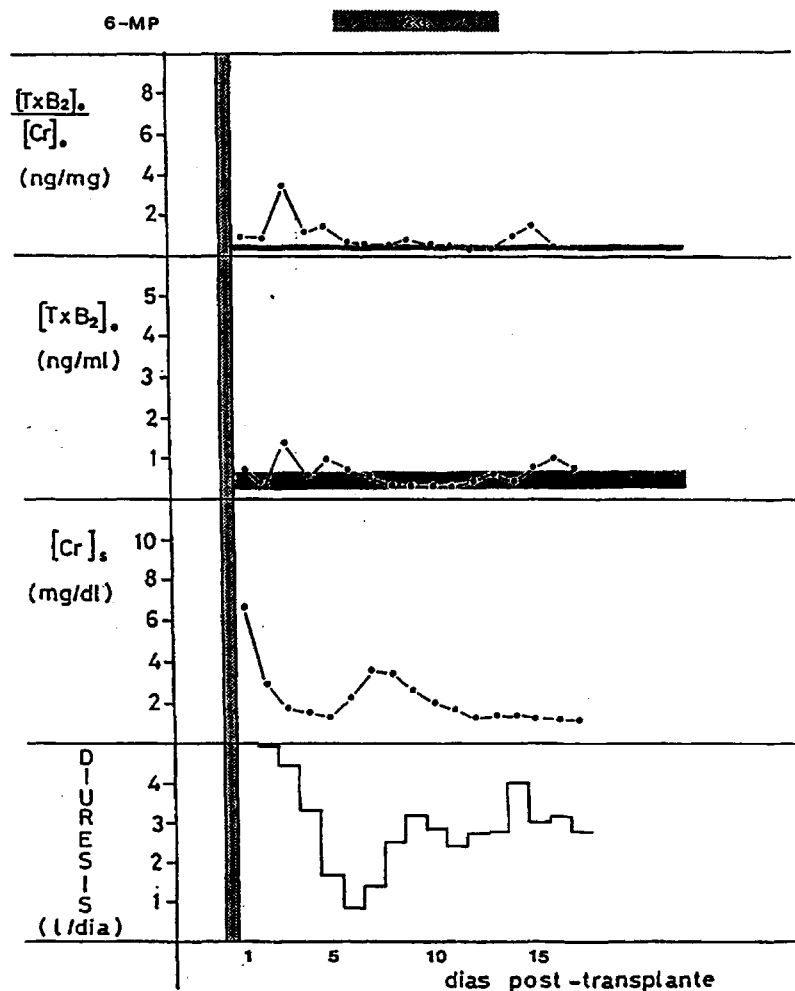


FIGURA 26.- Evolución típica de un sujeto con rechazo sobre transplante funcio-  
nante. Se observa la elevación de  $TxB_2$  y  $TxB_2/Cr$  previa al diagnós-  
tico clínico de rechazo, marcada por el inicio del tratamiento con  
terapia inmunosupresora de choque, y un ligero efecto de rebote en  
ambos parámetros al cesar ésta. 6-MP: 6-metilprednisolona.

En 4 ocasiones la evolución fué mala, abocando a la nefrectomía (2 casos) o al exitus (2 casos). En el primer caso, el paciente falleció por candidiasis sistémica, sin colonización del injerto, el día 20 de evolución. Había presentado crisis de rechazo, confirmado por biopsia, con mejoría funcional transitoria bajo tratamiento y con empeoramiento preterminal. La necropsia demostró la persistencia de signos histológicos de rechazo. Los valores de  $\text{TxB}_2$  permanecieron elevados, aunque de manera inconstante durante los 20 días de evolución.

En el segundo caso se trató de una crisis muy severa de rechazo, instaurado el día 8 de evolución, con rotura del injerto y nefrectomía el día 9. El  $\text{TxB}_2$ , previamente normal, se elevó coincidiendo con el diagnóstico de rechazo.

El tercer caso falleció por encefalitis herpética fulminante el día 18. El enfermo había recibido tratamiento anti-rechazo los días 6 al 9 de postoperatorio, con respuesta funcional y normalización del  $\text{TxB}_2$  urinario (Figura 27). En las 48 horas previas al exitus se detectó elevación de la creatinina y del  $\text{TxB}_2$ . La necropsia evidenció la persistencia de rechazo.

El cuarto caso terminó en nefrectomía el día 47 de evolución tras demostrar la biopsia un severo rechazo vascular. Durante el tratamiento del rechazo, la concentración de  $\text{TxB}_2$  fué normal pero el cociente  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  se elevó algunos días de manera irregular. Simultáneamente, la enferma presentó una infección por citomegalovirus.

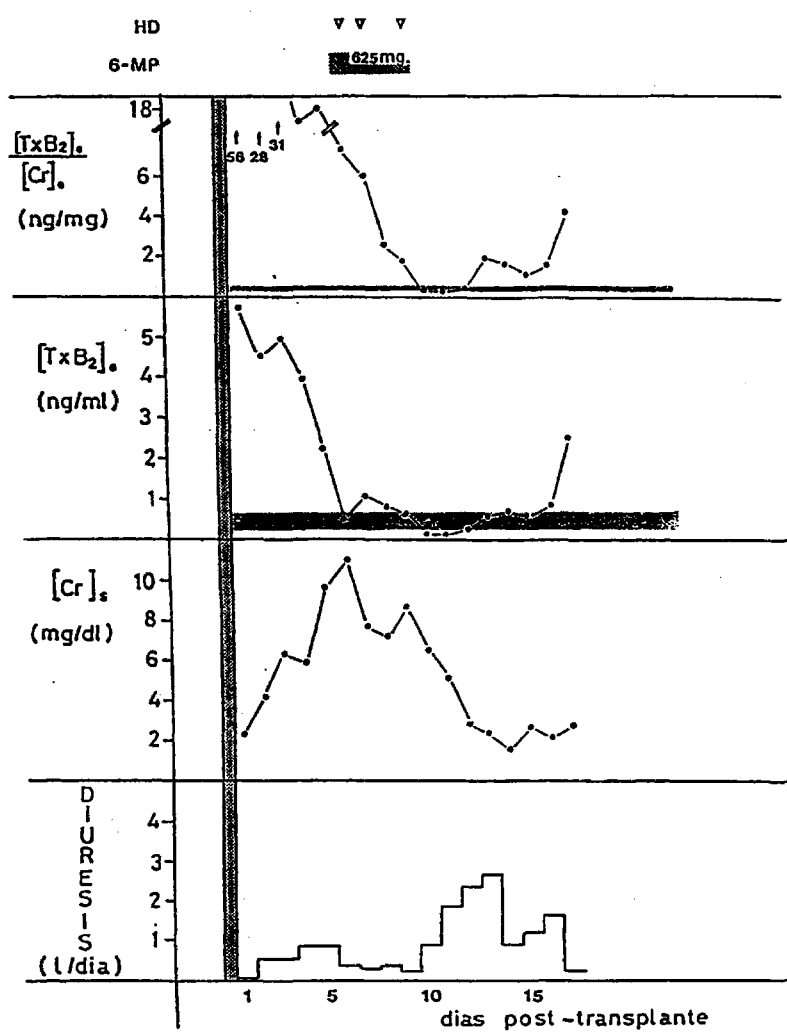


FIGURA 27.- Transplante renal con rechazo refractario.  $TxB_2$  y  $TxB_2/Cr$  se normalizan por el tratamiento inmunosupresor pero se elevan al suspenderse éste. HD: hemodiálisis.

#### 4.2.3.- GRUPO C: NECROSIS TUBULAR AGUDA SIN RECHAZO.

El comportamiento global de este grupo es análogo al del trasplante no complicado: normalización de ambos parámetros a partir del tercer día ( $p < 0'05$  para  $TxB_2$  y  $p < 0'01$  para  $TxB_2/Cr$ ; Figura 28).

#### 4.2.4.- GRUPO D: RECHAZO SOBRE NECROSIS TUBULAR AGUDA PREVIA.

En ésta situación se observan las elevaciones más intensas y sostenidas, tanto de la concentración de  $TxB_2$  (Figura 29) como del cociente  $TxB_2/Cr$  (Figura 30), con un patrón claramente diferenciado de la necrosis tubular sin rechazo. Así, se observan diferencias significativas en los valores de  $TxB_2$  en los días 2 a 5 post-trasplante entre estos grupos ( $p < 0'05$ ) y entre los días 3 ( $p < 0'01$ ), 4 y 5 ( $p < 0'05$ ) para el cociente  $TxB_2/Cr$ .

Estos enfermos evolucionaron generalizadamente con oliguria y valores muy elevados de creatinina plasmática que hicieron que necesitasen tratamiento sustitutivo con diálisis. Así, en el caso mostrado en la Figura 31 fueron necesarias 6 sesiones de hemodiálisis entre las cuales la creatinina plasmática llegó a niveles de  $12'1 \text{ mg/dl}$  ( $1.070 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ).

TxB<sub>2</sub> EN NTA

N = 5

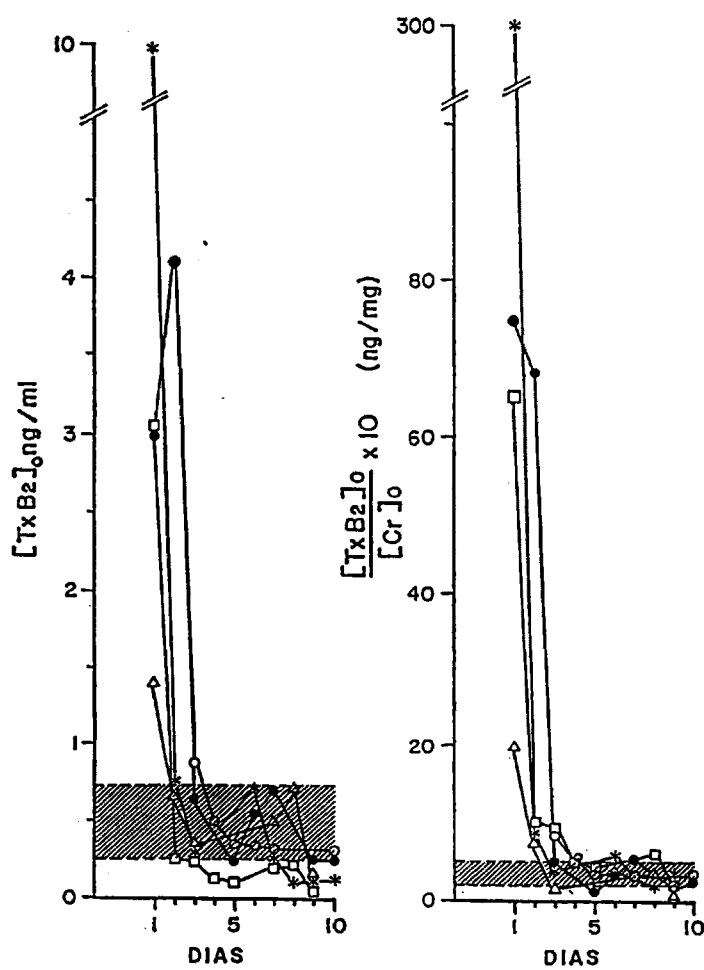
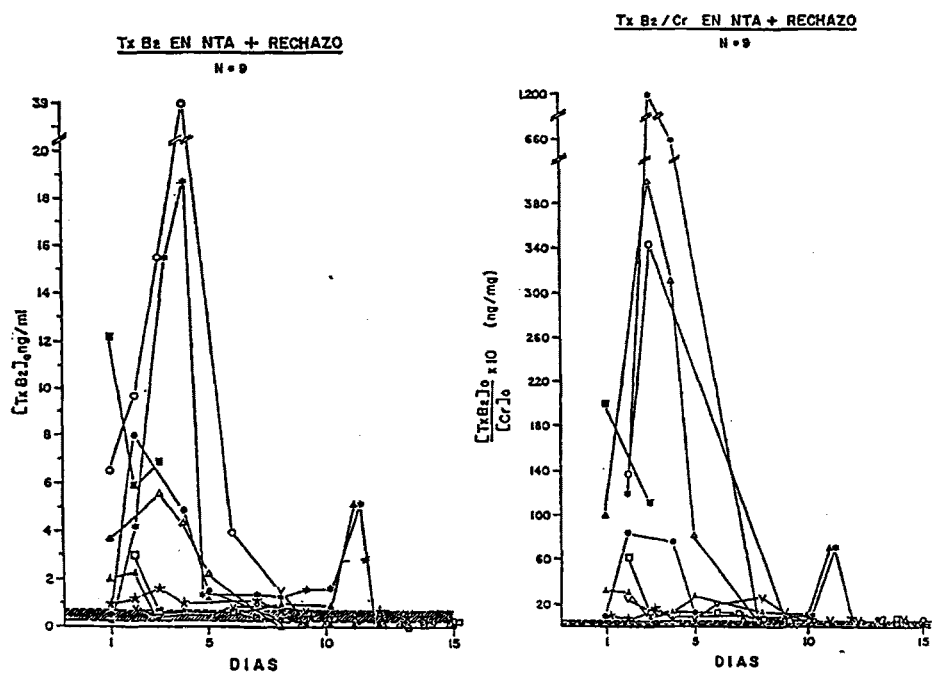


FIGURA 28.- Evolución individualizada de los valores de TxB<sub>2</sub> y TxB<sub>2</sub>/Cr en pacientes con necrosis tubular aguda.



FIGURAS 29 y 30.- Evolución individualizada de los valores de TxB<sub>2</sub> y TxB<sub>2</sub>/Cr urinarios en necrosis tubular aguda con rechazo asociado.

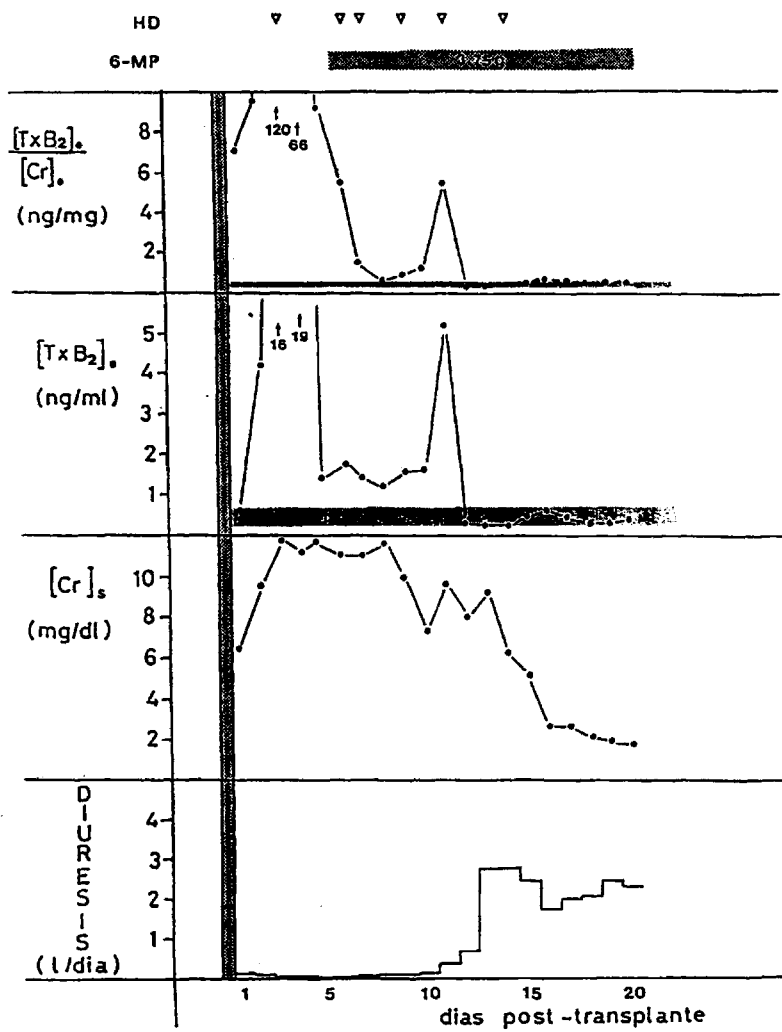


FIGURA 31.- Evolución típica de un paciente con rechazo sobre necrosis tubular aguda.

4.2.5.- SIGNIFICACIÓN DE LAS DETERMINACIONES DE  
 $TxB_2$  y  $TxB_2/Cr$ .

Para conocer la significación diagnóstica de una determinación aislada de  $TxB_2$ , se ha calculado el porcentaje de resultados anormalmente elevados en las diferentes circunstancias clínicas.

En ausencia de necrosis tubular aguda y de rechazo (Figura 32) sólo hay un 4% de falsos positivos. En los 3 días previos al diagnóstico clínico de rechazo (prerrechazo), un 36% de las determinaciones son altas, porcentaje que disminuye al 11% durante el tratamiento antirrechazo; después de suspender el tratamiento (rechazo clínicamente controlado) un 8% de las determinaciones son falsos positivos.

Cuando el rechazo incide sobre necrosis tubular, el 100% de las determinaciones realizadas durante los 3 días previos al diagnóstico de rechazo son altas. Considerando globalmente todas las crisis de rechazo (tanto si la situación previa es normal como si incide sobre necrosis tubular) se aprecian un 7% de falsos positivos y un 38% de falsos negativos.

El cociente  $TxB_2/Cr$  (Figura 33) presenta una elevación previa al diagnóstico clínico de rechazo en el 70% de los casos en el grupo de evolución inicial satisfactoria y en un 91% de los casos que cursan con necrosis tubular aguda. La sensibilidad global de éste parámetro es mayor (77%) que la del  $TxB_2$  pero a expensas de un mayor número de falsos positivos (18%).



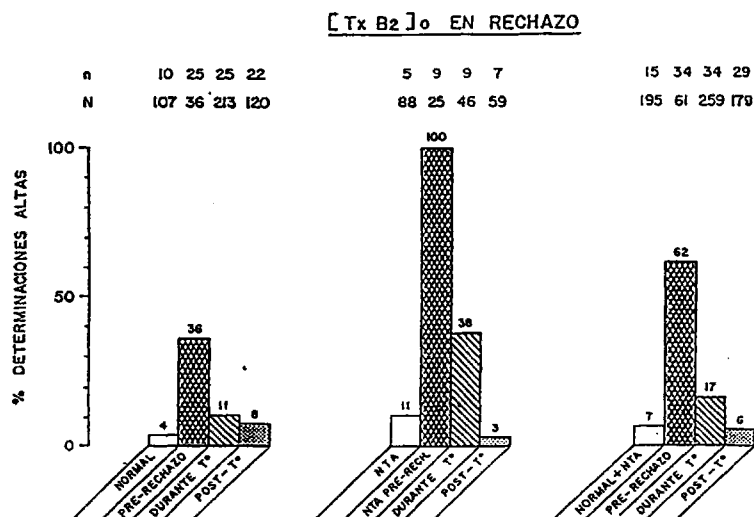


FIGURA 32.- Utilidad de las determinaciones de TxB<sub>2</sub> urinario en el diagnóstico de rechazo y rechazo sobre necrosis tubular aguda. El término "pre-rechazo" se refiere a los 3 días previos al diagnóstico clínico. T°: tratamiento-rechazo. n: número de casos; N: número de determinaciones analíticas.

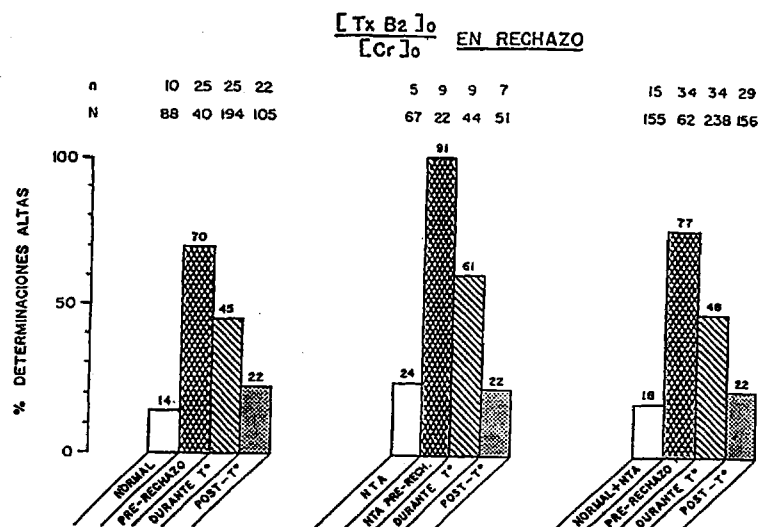


FIGURA 33.- Utilidad de las determinaciones de TxB<sub>2</sub>/Cr urinarios en el diagnóstico de rechazo y rechazo sobre necrosis tubular aguda. El término "pre-rechazo" se refiere a los 3 días previos al diagnóstico clínico. T°: tratamiento-rechazo. n: número de casos; N: número de determinaciones analíticas.

La aplicación del teorema de Bayes sobre el conjunto de signos y síntomas habitualmente utilizados en el diagnóstico de rechazo (Tabla VIII), proporciona las probabilidades diagnósticas que se muestran en la Tabla IX, columna a, en el diagnóstico diferencial de necrosis tubular y rechazo (asociado o no a necrosis tubular).

Los valores de la probabilidad "a priori" de encontrar el proceso considerado, se basan en los datos de frecuencia de esos diagnósticos en la población estudiada. Se observa, que no se puede distinguir entre procesos de rechazo o de necrosis tubular ya que ambos muestran un conjunto de signos y síntomas muy similar. Así, los parámetros clínicos y bioquímicos habitualmente considerados como sugestivos de rechazo se observan en ausencia de él. De cada 100 casos sugestivos, 44 se deberán a rechazo sobre injerto funcionante, 42 a necrosis tubular y 14 a rechazo más necrosis tubular.

Sin embargo, la adición de  $TxB_2$  (Tabla IX, b) o del  $TxB_2/Cr$  (Tabla IX, c) hace que se obtenga una mayor especificidad para el diagnóstico de rechazo. Si se utilizan simultáneamente  $TxB_2$  y  $TxB_2/Cr$ , se obtiene un conjunto de parámetros que distingue de una manera prácticamente absoluta los procesos de rechazo frente a los de necrosis tubular sin rechazo (Tabla IX, d).

TABLA VIII.- UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS MAS HABITUALMENTE EMPLEADOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE RECHAZO

Y NECROSIS TUBULAR AGUDA.

PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS CLÁSICOS O HABITUALES

DIAGNÓSTICO	PROBABILIDAD A PRIORI	FIEBRE > 38°C	↑ PESO	↓ DIURESIS	↑ TENSION ARTERIAL	SIGNOS LOCALES	↓ Efn	PROTEI- NURIA	HEMATU- RIA	↑ Cr	ECO- GRAFÍA	TxB <sub>2</sub>	TxB <sub>2</sub> /Cr
RECHAZO (R)	0'51	0'82	0'91	0'81	0'32	0'18	0'70	0'50	0'10	1'00	0'62	0'52	0'80
NTA	0'10	0'60	0'80	1'00	0'20	0'20	0'60	1'00	0'80	1'00	0'40	0'10	0'20
R + NTA	0'18	0'89	1'00	1'00	0'11	0'56	0'56	0'25	0'11	1'00	0'78	1'00	1'00
BUENA EVOLUCIÓN	0'21	0'10	0'10	0'10	0'10	0'10	0'20	0'10	0'10	0'10	0'10	0'20	0'40

- 06 -

TABLA IX.- DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE PARÁMETROS ALTERADOS EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS

DIAGNÓSTICO	<u>a</u> SIGNOS CLÁSICOS	<u>b</u> a + TxB <sub>2</sub>	<u>c</u> a + TxB <sub>2</sub> /Cr	<u>d</u> a + TxB <sub>2</sub> *TxB <sub>2</sub> /Cr
RECHAZO	44	57	62	56
NTA	42	10	14	3
RECHAZO + NTA	14	33	24	41
BUENA EVOLUCIÓN	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0

#### 4.3.- DISCUSIÓN

Los resultados encontrados confirman que las crisis de rechazo agudo se acompañan de elevación del  $\text{TxB}_2$  urinario (82% de los casos) y que la ausencia de elevación (falsos negativos) se aprecia fundamentalmente en casos de rechazo leve con escaso deterioro funcional y fácil control al intensificar la inmunosupresión (5 de 6 casos).

El aumento del  $\text{TxB}_2$  urinario no se debe a la agresión quirúrgica, cuyo efecto queda limitado a las primeras 48 horas, como se había observado en cirugía experimental (93). Por otra parte, se produce pese a los efectos potenciales de la prednisona-inhibidor de la fosfolipasa  $A_2$  (17)- y de la azatioprina -inhibidor de la tromboxano sintetasa, al poseer un grupo imidazol (127)-.

En la utilidad del  $\text{TxB}_2$  como marcador precoz y fiable del rechazo en trasplante renal cabe diferenciar entre dos circunstancias clínicas en función de la diferente dificultad diagnóstica que conllevan: rechazo sobre el riñón previamente funcionando y rechazo sobre necrosis tubular aguda. En el caso de buena función previa del injerto, la determinación del  $\text{TxB}_2$  urinario permite confirmar el 76% de las crisis. Sólo se han observado 2 elevaciones del  $\text{TxB}_2$  no atribuibles a rechazo: en una ocasión se asoció a febrícula y no puede descartarse un rechazo subclínico de evolución favorable con la inmunosupresión basal; la otra observación corresponde a un gran hematoma peri

renal en el inmediato postoperatorio; dada la facilidad con que la ecosonografía permite en la actualidad detectar las colecciones líquidas perirrenales, esta situación no plantea especiales dificultades diagnósticas. No se ha observado ningún caso de trombosis venosa profunda, circunstancia en la que también se aprecia un marcado aumento del  $\text{TxB}_2$  urinario (91). Este aumento no se produce por infección urinaria ni por infección sistémica sin rechazo, lo que hace del  $\text{TxB}_2$  urinario un parámetro más específico que la beta-2-microglobulina (66).

Aparte de su contribución en la confirmación no invasiva del rechazo, con un número aceptable de falsos positivos y negativos, el  $\text{TxB}_2$  urinario aumenta unas 48 horas de promedio antes de que el diagnóstico clínico de rechazo sea posible. Sin negar que esta precocidad permite una sospecha de rechazo inminente, podría ser aventurado iniciar el tratamiento antirrechazo basado exclusivamente en el aumento aislado del  $\text{TxB}_2$ , en ausencia de deterioro funcional y de otros datos clínicos, por lo que la aportación adicional del  $\text{TxB}_2$  no parece de importancia relevante para el diagnóstico de rechazo sobre riñón funcionante.

La administración intravenosa de 6-metil-prednisolona como tratamiento del rechazo disminuye inmediatamente el  $\text{TxB}_2$  urinario, independientemente de que el rechazo sea corticosen-sible o corticorresistente. En general, llega a normalizarse en los casos con buena evolución, aunque una cuarta parte de ellos experimenta un fenómeno de rebote pasajero al suspender

el tratamiento. Por el contrario, cuando el rechazo es refractario, el descenso del  $\text{TxB}_2$  no es completo y constituye un parámetro de cierto valor pronóstico.

Cuando el rechazo incide sobre necrosis tubular aguda previa, el hallazgo fundamental es que no hay falsos negativos: todos los casos cursaron con elevación del  $\text{TxB}_2$  urinario. La dificultad del diagnóstico en ésta situación resalta la importancia de éste hecho, aunque, al mismo tiempo, obliga a extremar la cautela. En nuestro caso, consideramos que los diagnósticos de rechazo sobreañadidos a necrosis tubular aguda son fiables dada la conjunción de datos clínicos y exploraciones en que se basó y al meticuloso análisis retrospectivo realizado; en éste sentido, es significativo que se diagnosticaran 0'64 crisis/enfermo con necrosis tubular y 0'75 crisis/enfermo con riñón funcionando; que 7 de 9 casos evolucionaron favorablemente con tratamiento antirrechazo; y que los 2 casos corticorresistentes están confirmados histológicamente.

Las diferencias observadas en el  $\text{TxB}_2$  cuando el rechazo incidió sobre necrosis tubular en comparación al rechazo sobre riñón funcionando, no son imputables a modificaciones de la inmunosupresión, ya que no existió. El análisis de los casos con necrosis tubular sin rechazo permite también excluir que el proceso necrosis-regeneración tubular modifique la excrección urinaria de  $\text{TxB}_2$ . Es posible atribuir aquéllas diferencias a la mayor seriedad del rechazo en los casos de necrosis tubular. En éste sentido parecen apuntar tanto la precoz instauración del

rechazo (día 5 frente a día 9 de evolución como promedio), como el hecho de que 2 de los 9 casos tuvieran que ser nefrectomizados con signos intensos de rechazo vascular y rotura renal.

Por consiguiente, la determinación de  $\text{TxB}_2$  urinario es de gran utilidad en el diagnóstico de rechazo sobre necrosis tubular aguda, por cuanto es un procedimiento no invasivo, constantemente alterado y utilizable en una situación con especiales dificultades diagnósticas al no poder disponer de parámetros funcionales.

Para perfilar aún más la utilidad de este parámetro se ha intentado delimitar el valor diagnóstico de una determinación aislada, cuantificando los fasos positivos y los fasos negativos en las diferentes situaciones clínicas. Los resultados corroboran las conclusiones anteriores: en cuanto a la concentración urinaria de  $\text{TxB}_2$ , un 11% de las determinaciones en situación de necrosis tubular aguda son falsos positivos, pero no hay falsos negativos; es decir, una determinación normal permitiría excluir la existencia de rechazo. En cuanto al cociente  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$ , parece menos específico (24% de falsos positivos) y menos sensible (91% de los casos).

El origen del  $\text{TxB}_2$  urinario que se mide, no se conoce de manera precisa. En ausencia de trombosis venosa profunda y de hematoma perirrenal, parece clara su procedencia intrarrenal (91), verosíblemente en relación con la participación de plaquetas (128), las cuales son la principal fuente endógena de tromboxano conocida. Estas plaquetas son acumuladas con ma-

por intensidad en los procesos de rechazo (83).

Además de las plaquetas, existe también una acumulación y activación de macrófagos (129), los cuales son capaces de sintetizar tromboxanos (130); y los linfocitos, además de poder sintetizar ellos mismos tromboxano (59), son capaces de estimular la producción de este por parte de los macrófagos (131). Pero su papel en el fenómeno de rechazo continua siendo una incógnita.

En resumen, los hallazgos realizados apoyan algunos preliminares (91, 92) y permiten cuantificar la utilidad de la determinación de  $TxB_2$  urinario en el diagnóstico precoz del rechazo en trasplante renal. Hasta ahora no se había diferenciado entre riñón funcionante y necrosis tubular aguda, siendo esta nuestra principal aportación por lo necesario que es diferenciar entre ambos estados para un mejor tratamiento de cada uno y un menor riesgo para el enfermo.



## CONCLUSIONES

- 1.- La determinación de  $\text{TxB}_2$  urinario mediante radioinmunoensayo, con las innovaciones introducidas por nosotros, es una técnica precisa, exacta y sensible. Asimismo, se han estudiado y controlado la influencia de las condiciones de recogida y almacenamiento de las muestras y la interferencia de la cirugía, células sanguíneas y fármacos empleados en el tratamiento de éstos enfermos.
- 2.- Los enfermos transplantados de riñón con buena evolución postoperatoria o con necrosis tubular aguda, muestran valores normales de  $\text{TxB}_2$  y del cociente  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  en orina.
- 3.- El rechazo agudo provoca una elevación de  $\text{TxB}_2$  y  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  48 horas antes, como promedio, del diagnóstico clínico. El  $\text{TxB}_2$  muestra una especificidad global del 93% y una sensibilidad del 62%. El  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  es más sensible (77%) pero menos específico (82%).
- 4.- Los valores más elevados de  $\text{TxB}_2$  y  $\text{TxB}_2/\text{Cr}$  se observan cuando el rechazo incide sobre necrosis tubular aguda previa.
- 5.- Por consiguiente, la determinación de  $\text{TxB}_2$  urinario

constituye una aportación sustancial en el manejo correcto del enfermo transplantado, especialmente para el diagnóstico precoz de rechazo en presencia de necrosis tubular.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- MITCHELL JRA.  
Clinical aspects of the arachidonic acid-thromboxane pathway.  
Br. Med. Bull. 39: 289-295, 1983.
- 2.- GRANSTROM E.  
Prostaglandin biochemistry, pharmacy and physiological function.  
Acta Obstet. Gynecol. Scand. Supp 1 113: 9-13, 1983.
- 3.- HALUSHKA PV; DOLLERY CT, MacDERMOT J.  
Thromboxane and prostacyclin in disease: a review.  
Quart. J. Med. 208: 461-470, 1983.
- 4.- YLIKORKALA O, KAILA J, VIINIKKA L.  
Prostacyclin and thromboxane in diabetes.  
Br. Med. J. 283: 1148-1150, 1981.
- 5.- REINES HD, HALUSHKA PV, COOK JA, WISE WC, RAMBO W.  
Plasma thromboxane levels are evaluated in patients dying with septic shock.  
Lancet, ii: 174-175, 1982.
- 6.- NISHIKAWA K, MORRISON AR, NEEDLEMAN P.  
Exaggerated prostaglandin biosynthesis and its influence on renal resistance in the isolated hydronephrotic kidney.  
J. Clin. Invest. 59: 1143-1150, 1977.
- 7.- MORRISON AR, THORNTON F, BLUMBERG A, VAUGHAN ED.  
Thromboxane A<sub>2</sub> is the major arachidonic acid metabolite of human cortical hydronephrotic tissue.  
Prostaglandins, 21: 471-481, 1981.
- 8.- YARGER WE, SCHOCKEN DD, HARRIS RH.  
Obstructive nephropathy in the rat. Possible roles for the renin-angiotensin system, prostaglandins and thromboxanes

in postobstructive renal function.  
J. Clin. Invest. 65: 400-412, 1980.

- 9.- COKER SJ, PARRAT JR, LEDINGHAM MCA, ZEITLIN IJ.  
Thromboxane and prostacyclin release from ischaemic myocardium  
in relation to arrhythmias.  
Nature, 291: 323-324, 1980.
- 10.- HIRSH PD, CAMPBELL WB, WILLERSON JT, HILLIS LD.  
Prostaglandins and ischemic heart disease.  
Am.J. Med. 71: 1009-1026, 1981.
- 11.- KIMBERLY RP.  
Renal prostaglandins in lupus erithematosus.  
Lancet, ii: 553-555, 1978.
- 12.- ZIPSER RD, RADVAN GH, KRONBORG IJ, DUKE R, LITTLE TE.  
Urinary thromboxane B<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> in the hepatorenal  
syndrome: evidence for increased vasoconstrictor and decreased  
vasodilator factors.  
Gastroenterology, 84: 697-703, 1983.
- 13.- ZIPSER RD, KRONBORG I, RECTOR W, REYNOLDS T, DASKALOPOULOS G.  
Therapeutic trial of thromboxane synthesis inhibition in the  
hepatorenal syndrome.  
Gastroenterology, 87: 1228-1232, 1984.
- 14.- FISHER M, ZIPSER R.  
Increased excretion of immunoreactive thromboxane B<sub>2</sub> in  
cerebral ischemia.  
Stroke, 16: 10-14, 1985.
- 15.- METZLER DE.  
Biochemistry: the chemical reactions of living cells.  
Academic Press. New York, 1977. pp: 705-707.

- 16.- CRAWFORD MA.  
Background to essential fatty acids and their prostanoids derivatives.  
Br. Med. Bull. 39: 210-213, 1983.
- 17.- BACKWELL GJ, FLOWER RJ.  
Inhibition of phospholipase.  
Br. Med. Bull. 39: 260-264, 1983.
- 18.- BLACKWELL GJ, CARNUCCIO R, di ROSSA M, FLOWER R, PARENTE L, PERSICO P.  
Macro cortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids.  
Nature, 287: 147-149, 1980.
- 19.- HIRATA F, SCHIFFMAN E, VENKATASUBRAMANIAN K, SALOMON D, AXELROD J.  
A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 2533-2536, 1980.
- 20.- BAKHLE YS.  
Synthesis and catabolism of cyclo-oxygenase products.  
Br. Med. Bull. 39: 214-218, 1983.
- 21.- van der OUDERAA J, BUYTENHEK M, NUGTEREN DH, van DORP DA.  
Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands.  
Biochem. Biophys. Acta 487: 315-331, 1977.
- 22.- SAMUELSSON B, GOLDBYNE M, GRANSTROM E, HAMBERG M, HAMMARSTROM S, MALMSTEN C.  
Prostaglandins and thromboxanes.  
Ann. Rev. Biochem. 47: 997-1002, 1978.

- 23.- ROTH GJ, SIOK CJ, OZOLS J.  
Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular glands.  
J. Biol. Chem 255: 1301-1304, 1980.
- 24.- STANFORD N, ROTH GJ, SHEN TY, MAJERUS P.  
Lack of covalent modification of prostaglandin synthetase (cyclo-oxygenase) by indomethacin.  
Prostaglandins, 13: 669-675, 1977.
- 25.- HUMES JL, WINTER CA, SADOWSKI SJ, KUEHL Jr FA.  
Multiple sites on prostaglandin cyclooxygenase are determinants in the action of nonsteroidal antiinflammatory agents.  
Proc. Nat. Acad. Sci, USA. 78: 2053-2056, 1981.
- 26.- OGINO N, MIYAMOTO T, YAMAMOTO S, HAYAISHI O.  
Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione requiring enzyme.  
J. Biol. Chem. 252: 890-895, 1977.
- 27.- HAMMARSTROM S, FALARDEAU P.  
Resolution of prostaglandin endoperoxide synthetase and thromboxane synthase of human platelets.  
Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 74: 3691-3695, 1977.
- 28.- YASHIMOTO T, YAMAMOTO S, OKUMA M, HAYAISHI O.  
Solubilization and resolution of thromboxane synthesizing system from microsomes of bovine blood platelets.  
J. Biol. Chem. 252: 5871-5874, 1977.
- 29.- NEEDLMAN P, RAZ A, FERRENDELLI JA, MINKES M.  
Application of imidazole as a selective inhibitor of thromboxane synthetase in human platelets.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74: 1716-1720, 1977.

- 30.- HAMBERG M, SVENSSON J, SAMUELSSON B.  
Thromboxanes: a new group of biologically active compounds  
derived from prostaglandin endoperoxides.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 2994-2998, 1975.
- 31.- MONCADA S, FERREIRA SH, VANE JR.  
Bioassay of prostaglandins and biologically active substances  
derived from arachidonic acid.  
Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research. Vol. 5 J.C.  
Frolich, ed. Raven Press, New York 1978. pp: 211-236.
- 32.- BHAGWAT SS, HAMANN PR, STILL WC, BUNTING S, FITZPATRICK PA.  
Synthesis and structure of the platelet aggregation factor  
thromboxane B<sub>2</sub>.  
Nature, 315: 511-513, 1985.
- 33.- ANGGARD E, OLIW E.  
Formation and metabolism of prostaglandins in the kidney.  
Kidney Int. 19: 771-780, 1981.
- 34.- SUN FF, TAYLOR BM, MCGUIRE JC, WONG PYK.  
Metabolism of prostaglandins in the kidney.  
Kidney Int. 19: 760-770, 1981.
- 35.- KINDAHL H.  
Metabolism of thromboxane B<sub>2</sub> in the cynomolgus monkey.  
Prostaglandins, 13: 619-629, 1977.
- 36.- ROBERTS II LJ, SWEETMAN BJ, MORGAN JL, PAYNE NA, OATES JA.  
Identification of the major urinary metabolites of thromboxane  
B<sub>2</sub> in the monkey.  
Prostaglandins, 13: 631-647, 1977.
- 37.- ROBERTS II LJ, SWEETMAN BJ, OATES JA.  
Metabolism of thromboxane B<sub>2</sub> in the monkey.  
J. Biol. Chem. 253: 5305-5318. 1978.

- 38.- ROBERTS II LJ, SWEETMAN BJ, OATES JA.  
Metabolism of thromboxane B<sub>2</sub> in man.  
J. Biol. Chem. 256: 8384-8393, 1981.
- 39.- ROBERTS II LJ, SWEETMAN BJ, PAYNE NA, OATES JA.  
Metabolism of thromboxane B<sub>2</sub> in man.  
J. Biol. Chem. 252: 7415-7417, 1977.
- 40.- BROYER M, BRUNNER PP, BRYNGER FP, DONKERWOLKE RA, KRAMER P,  
SELWOOD NH, WING AJ.  
Combined report on regular dialysis and transplantation in  
Europe.XII, 1981.  
Proc. Eur. Dial. Transplant Ass. 19: 2-59, 1982.
- 41.- CARPENTER CG.  
Clinical histocompatibility testing: a brief historical  
perspective.  
Transplant. Proc. XIII: 55-60, 1981.
- 42.- STROM TB.  
Immunosuppressive agents in renal transplantation.  
Kidney Int. 26 353-356, 1984.
- 43.- SHACKELFORD DA, KAUFMAN JF, JORMAN AJ, STROMINGER JL.  
HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations,  
gene cloning and function.  
Immunol. Rev. 66: 133-187, 1982.
- 44.- FENSTENSTEIN H.  
Renal replacement therapy: immunogenetic aspects of  
transplantation.  
Postgraduate Nephrology. F.P. Marsh, ed. William Heinemann  
Medical Books. London, 1985. pp: 579-605.
- 45.- NAJARIAN JS, ASCHER NL.  
Causes and management of rejection.  
Transplant. Proc. XI: 11-16, 1979.



- 46.- LAFFERTY KJ.  
Immunogenicity of foreign tissues.  
Transplantation, 29: 179-181, 1980.
- 47.- ENGELMAN EG, BENIKE CJ, GRUMET PC, EVANS RL.  
Activation of human T lymphocyte subsets: helper and  
suppressor cytotoxic T cells recognize and respond to  
distinct histocompatibility antigens.  
J. Immunol. 127: 2124-2129, 1981.
- 48.- SMITH KA, LACHMAN LB, OPPENHEIM JJ, FAVATA MF.  
The functional relationship of the interleukins.  
J. Exp. Med. 151: 1551-1556, 1980.
- 49.- TILNEY NL, KUPIEK- WEGLINSKI JW, HEIDECHE CD, LEAR PA,  
STROM TB.  
Mechanisms of rejection and prolongation of vascularized  
organ allografts.  
Immunol. Rev. 77: 185-216, 1983.
- 50.- STROM TB, TILNEY NL, CARPENTER CB, BUSCH CJ.  
Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal  
allografts.  
N. Engl. J. Med. 292: 1257-1263, 1976.
- 51.- HAYRY P.  
Intragrafts events in allograft destruction.  
Transplantation, 38: 1-6, 1984.
- 52.- MILGROM F.  
Role of humoral antibodies in transplantation.  
Transplant. Proc. IX: 721-726, 1977.
- 53.- ASCHER NL, HOFFMAN R, HANTO DW, SIMMONS RL.  
Cellular events within the rejecting allograft.  
Transplantation, 35: 193-197, 1983.

- 54.- HALL BH, BISHOP GA, FARNSWORTH A, DUGGIN GG, HORVATH JS,  
SHEIL AGR, TILLER DJ.  
Identification of the cellular subpopulations infiltrating  
rejecting cadaver renal allografts.  
Transplantation, 37: 564-570, 1974.
- 55.- BUCKELS JAC, CHANDLER R, MCCOLLUM CN, BARNES AD.  
The early diagnosis of acute renal transplant rejection using  
Indium-111-labeled platelets.  
Transplant.Proc.XV: 1192-1194, 1983.
- 56.- BUNTING S, MONCADA S, VANE JR.  
The prostacyclin-thromboxane  $A_2$  balance: pathophysiological  
and therapeutic implications.  
Br.Med.Bull.39: 271-276, 1983.
- 57.- MUROTA S-T, KAWAMURA M, MORITA I.  
Transformation of arachidonic acid into thromboxane  $B_2$  by the  
homogenates of activated macrophages.  
Biochim.Biophys.Acta, 528: 507-511, 1978.
- 58.- HANSH GM, SEITZ M, MARTINOTTI G, BETZ M, RAUTERBERG EW,  
GEMSA D.  
Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin  $E_2$ , and  
thromboxane in response to late complement components.  
J. Immunol. 133: 2145-2150, 1984.
- 59.- PARKER CW, STENSON WF, HUBER MG, KELLY JP.  
Formation of thromboxane and hydroxyarachidonic acid in  
purified human lymphocytes in the presence and absence of PHA.  
J. Immunol.122: 1572-1577, 1979.
- 60.- GOLDSTEIN IM, MALMSTEN CL, KINDAHL H, KAPLAN HB, RADMARK O,  
SAMUELSSON B, WEISSMAN G.  
Thromboxane generation by human peripheral blood polymor-  
phonuclear leucocytes.  
J. Exp.Med.148: 787-791, 1978.

- 61.- KELLY JP, JOHNSON MC, PARKER CW.  
Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism  
mitogenesis in human lymphocytes: possible role of thromboxanes  
and products of the lipxygenase pathway.  
J. Immunol. 122: 1563-1571, 1979.
- 62.- LEUNG KH, MIHICH E.  
Prostaglandin modulation of development of cell-mediated  
immunity in culture.  
Nature, 288: 597-600, 1980.
- 63.- STENSON WF, PARKER CW.  
Prostaglandins, macrophages, and immunity.  
J. Immunol. 125: 1-5, 1980.
- 64.- WELLWOOD JM, DAVIES D, LEIGHTON M, THOMPSON AE.  
Urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamidase assay in renal transplant  
recipient.  
Transplantation 26: 396-400, 1978.
- 65.- HORPACSY G, ZINSMEYER J, SCHRODER K, MEBEL M.  
Changes in serum and urine lysozyme activity after kidney  
transplantation: influence of graft function and therapy with  
azathioprine.  
Clin.Chem.24: 74-79, 1978.
- 66.- BERNSTEIN LH, RUSSELL P, HORENSTEIN JM.  
Urinary adenilate kinase activity as a predictor of renal  
allograft crises.  
Clin.Chem.31: 1151-1154, 1985.
- 67.- SANDMAN R, MARGULES RM, KOUMITZ SL.  
Urinary lisosomal glycosidases after renal allotransplantation:  
correlation of enzyme excretion with allograft rejection and  
ischemia.  
Clin.Chim. Acta 45: 349-359, 1973.

- 68.- STERIOFF S, ENGEN DE, TRACY R, YOUNG DS, ZINCKE H.  
Biochemical analysis of renal transplant rejection.  
Transplant.Proc.XV: 1747, 1983.
- 69.- THOMPSON RE, PIPER DJ, GALBERG C, CHAN TH, TOLKOFF-RUEIN NE,  
ROBIN RB.  
Adenosine deaminase binding protein, a new diagnostic marker  
for kidney disease.  
Clin.Chem.31: 679-683, 1985.
- 70.- ASPAR SK, WHITING PH, SIMPSON JG, CATTO GRD, ENGESSET J.  
Early diagnosis of rejection: correlation of enzymuria and  
histological findings after renal transplantation in the rat.  
Transplantation, 37: 548-551, 1984.
- 71.- MAURY CPJ, TEPPPO AM, EKLUND B, AHONEN J.  
Serum amyloid A protein: a sensitive indicator of renal  
allograft rejection in humans.  
Transplantation, 36: 501-504, 1983.
- 72.- WHITE J, MEYER E, HARDY MA.  
Prediction of onset and termination of renal allograft  
rejection by serum levels of C-reactive protein.  
Transplant.Proc.XIII 18: 682-685, 1981.
- 73.- FREED B, WALSH A, PIETROCOLA D, MacDOWELL R, LAFFIN R,  
LEMPERT N.  
Early detection of renal allograft rejection by serial  
monitoring of serum C-reactive protein.  
Transplantation, 37: 215-218, 1984.
- 74.- GROTH J, KADEN J, HOFFMAN P, MULLER K, MROCHEN H, MEBEL M.  
C-reactive protein and clinical kidney transplantation.  
Nephron, 37: 236-239, 1984.

- 75.- EDWARDS LC, HELDERMAN JH, HAMM LL, LUDWIN D, GALLIUNAS Jr P, HOLL AR.  
Non invasive monitoring of renal transplant function by analysis of beta<sub>2</sub>-microglobulin.  
Kidney Int.23: 767-770, 1983.
- 76.- ROXE DM, SIDDIQUI F, SANTHANAM S, del GRECO F, WOLF J.  
Rationale and application of beta<sub>2</sub>-microglobulin measurements to detect acute transplant rejection.  
Nephron,27: 260-264, 1981.
- 77.- BYFIELD PE, BARTH CL, BRODIE JA, COSIMI AB, DIENST SE, ELBERG AB, ELFRING GL.  
The use of circulating rosette-forming cells as a guide to determination of ATG dose (Dose-by-rosette).  
Transplant. Proc X: 627-631, 1978.
- 78.- HAISH CE, THOMAS F, THOMAS JM.  
Differential role of T-lymphocyte subsets in human acute allograft rejection.  
Transplant.Proc.XIII: 1746, 1981.
- 79.- THOMAS J, THOMAS F, EDWARDS E, HOFFMAN S, LEE HM.  
Regulation of T cell mediated cytotoxic allograft response in human transplant recipients.  
Transplant. Proc.XIII: 1594-1598, 1981.
- 80.- COSIMI AB, COLVIN RB, BURTON RC, RUBIN RH, GOLDSTEIN G, KUNG PC, HANSEN WP, DELMONICO FL, RUSSELL PS.  
Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts.  
N.Engl.J.Med.305: 308-314, 1981.
- 81.- BARNES RMR, ALEXANDER LC, STEEN S.  
Evaluation of immunologic parameters during renal graft rejection.  
Transplant.Proc.XV: 1789-1792, 1983.

- 82.- LEITHNER C, SINZINGER H, SILBERBAUER K, WOLF A, STUMMVOLL HK, PINGGERA N.  
Enhanced prostacyclin synthesis in acute human kidney transplant rejection.  
Proc. Eur. Dial. Transplant. Ass. 17: 424-428, 1980
- 83.- LEITHNER C, SINZINGER H, SCHWARZ M, POHANKA E.  
Radiolabelled platelets and prostacyclin in diagnosis of transplant rejection.  
Proc. Eur. Dial. Transplant. Ass. 19: 529-535, 1982
- 84.- SUNDRAM FX, EDMONSON RPS, ANG ES.  
<sup>99m</sup>Tc Sn Collids scans in the diagnosis of renal graft rejection.  
Proc. Eur. Dial. Transplant Ass. 22: 605-608, 1985.
- 85.- BELITSKY P, GUPTKA R, CAMPBELL J.  
Diagnosis of acute cellular rejection in kidney allografts by fine needle aspiration cytology.  
Transplant. Proc. XVI: 1076-1079, 1984.
- 86.- KREIS HA.  
Use of fine needle aspiration cytology to diagnose rejection.  
Transplant. Proc. XVI: 1569-1572, 1984.
- 87.- MADRAS PN, SIMPSON MA, MONACO AP.  
Monitoring the renal allograft rejection by immunofluorescence of tubular epithelial cells in the urine sediment.  
Transplant. Proc. XVI: 1583-1585, 1984.
- 88.- WALLE A, SUTHANTHIRON M, TANFIELD PA, YANKIVER B, RUBIN AL, STENZEL KH, DARZYNKIEWICZ Z.  
Multiparameter analysis of cell activation in renal allograft recipients.  
Transplant. Proc. XVI: 1586-1587, 1984.

- 89.- TANNENBAUM JS, ANDERSON CB, SICARD GA, McNEEL DW, THEREDGE EE.  
Prostaglandin synthesis associated with renal allograft rejection in the dog.  
Transplantation, 37: 438-443, 1984.
- 90.- COFFMAN TM, YARGER WE, KLOTMAN PE.  
Functional role of thromboxane production by acutely rejecting renal allografts in rats.  
J. Clin. Invest. 75: 1242-1248, 1985.
- 91.- FOGH ML, ZMUDA M, COOLEY C, WINCHESTER JF, HELFRICH GB, RAMWELL PW, SCHREINER GE.  
Urine  $i\text{-TxB}_2$  in renal allograft rejection.  
Lancet, ii: 431-434, 1981.
- 92.- FOGH ML, ALIJANI M, HELFRICH GB, SCHREINER GE, RAMWELL PW.  
Urine thromboxane as an immunologic monitor in kidney transplant patients.  
Transplant. Proc. XVI: 1603-1605, 1984.
- 93.- KHIRABADI RS, FOGH ML, RAMWELL PW.  
Urine immunoreactive thromboxane  $B_2$  in rat cardiac allograft rejection.  
Transplantation, 39: 6-8, 1985.
- 94.- OMINI C, MONCADA S, VANE JR.  
The effects of prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) on tissues which detect prostaglandins (PG'S).  
Prostaglandins, 14: 625-632, 1977.
- 95.- MORRISON AR, MISHIKAWA K, NEEDLEMAN P.  
Unmasking of thromboxane  $A_2$  synthesis by ureteral obstruction in the rabbit kidney.  
Nature, 267: 259-260, 1977.

- 96.- PUGLIESE F, CIABATTONI G.  
Investigations of renal arachidonic acid metabolites by radioimmunoassay.  
Prostaglandins and the kidney. Dunn MJ, Patrono C, Cinotti GA, eds. Plenum Press. New York, 1983, pp: 83-98.
- 97.- GRANSTROM E, SAMUELSSON B.  
Quantitative measurements of prostaglandins and thromboxanes: general considerations.  
Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research. Vol. 5. Frolich JC, ed. Raven Press. New York, 1978. pp: 1-13.
- 98.- CHIABRANDO C, NOSEDA A, FANELLI R.  
Separation of prostaglandins and thromboxane B<sub>2</sub> by high-resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry or electron-capture detection.  
J. Chromatogr. 250: 100-108, 1982.
- 99.- MORITA I, MUROTA S, SUZUKI M, ARIGA T, MIYATAKE T.  
Characterization of thromboxane B<sub>2</sub> and 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub> by combined gas chromatography and chemical-ionization mass spectrometry.  
J. Chromatogr. 154: 285-290, 1978.
- 100.- GRANSTROM E, KINDAHL H.  
Radioimmunoassay of prostaglandins and thromboxanes.  
Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research. Vol. 5. Frolich JC, ed. Raven Press. New York, 1978. pp: 119-210.
- 101.- FELBER JP.  
Radioimmunoassay in the clinical chemistry laboratory.  
Advances in Clinical Chemistry. Vol. 20. Bodansky O, Latner AL, eds. Academic Press. New York, 1978. pp: 130-179.
- 102.- GREEN K, HAMBERG M, SAMUELSSON B, FROLICH JC.  
Extraction and chromatographic procedures for purification of prostaglandins, thromboxanes, prostacyclin and their metabolites.





- Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research. Vol. 5.  
Frolich JC, ed. Raven Press. New York, 1978. pp: 15-38.
- 103.- KOLTOFF IM, SANDELL EB, NEHAN EJ, BRUCKENSTEIN S.  
Análisis Químico Cuantitativo. Nigar. Buenos Aires, 1972. pp:  
352-357.
- 104.- BROWN PR, KRSTULOVIC AM.  
Practical aspects of reversed-phase liquid chromatography  
applied to biochemical and biomedical research.  
Anal Biochem. 89: 1-21, 1979.
- 105.- RODBARD D, RAYFORD PL, COOPER JA, ROSS GT.  
Statistical quality control of radioimmunoassays.  
J. Clin. Endocrinol. 28: 1412-1419, 1968.
- 106.- POWELL WS.  
Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic  
acid from biological samples using octadecylsilyl silica.  
Prostaglandins, 20: 947-957, 1981.
- 107.- LEDERER JR, RILEY DL, DEMERS LM.  
Rapid extraction of arachidonic acid metabolites utilizing  
octadecyl reversed-phase columns.  
J. Chromatogr. 273: 402-409, 1983.
- 108.- ALI M, McDONALD JWD.  
Effect of sulfinpyrazone on platelet prostaglandin synthesis  
and platelet release of serotonin.  
J. Lab. Clin. Med. 89: 868-875, 1977.
- 109.- ELING T, TAINER B, ALLY A, WARNOK R.  
Separation of arachidonic acid metabolites by high-pressure  
liquid chromatography.  
Methods in Enzymology, 86: 511-517, 1982.

- 110.- Van ROLLINS M, HO HK, GRENWALD JE, ALEXANDER M, DORMAN NJ, WONG LK, HORROCKS LA.  
Complete separation by high-performance liquid chromatography of metabolites of arachidonic acid from incubation with human and rabbit platelets.  
Prostaglandins, 20: 571-577, 1980.
- 111.- TERRAGNO A, RYDZIK R, TERRAGNO NA.  
High performance liquid chromatography and UV detection for the separation and quantitation of prostaglandins.  
Prostaglandins, 21: 101-113, 1981.
- 112.- MARTYN BAILEY J, BRIANT RW, FEINMARK SJ, MAKHEJA AN.  
Differential separation of thromboxanes from prostaglandins by one and two dimensional thin layer chromatography.  
Prostaglandins, 13: 479-492, 1977.
- 113.- GOSWAMI SK, KINSELLA JF.  
Separation of prostaglandins A, B, C, D, E, F, thromboxane and 6-keto prostaglandin  $F_{1\alpha}$  by thin-layer chromatography.  
J. Chromatogr. 209: 334-336, 1981.
- 114.- WHORTON AR, CARR K, SMIGEL M, WALKER L, ELLIS K, OATES JA.  
Reversed-phase high-performance liquid chromatography of prostaglandins: biological applications.  
J. Chromatogr. 163: 64-71, 1979.
- 115.- ALAM I, OHUCHI K, LEVINE L.  
Determination of cyclooxygenase products and prostaglandin metabolites using high-pressure liquid chromatography and radioimmunoassay.  
Anal. Biochem. 93: 339-345, 1979.
- 116.- COCKRELL CS, ELLIS EF.  
Simple single-step high-performance liquid chromatographic method for the separation of cyclooxygenase and lipxygenase enzyme metabolites of arachidonic acid.  
J. Chromatogr. 308: 316-321, 1984.

- 117.- ZIJLSTRA FJ, VINCENT JE.  
Determination of leukotrienes and prostaglandins in  $^{14}\text{C}$   
arachidonic acid labelled human lung tissue by high-performance  
liquid chromatography and radioimmunoassay.  
J. Chromatogr. 311: 39-50, 1984.
- 118.- MCANN DS, TOKARSKY J, SORKIN RP.  
Radioimmunoassay for plasma thromboxane  $\text{B}_2$ .  
Clin. Chem. 27: 1417-1420, 1981.
- 119.- RODBARD D.  
Statistical estimation of the minimal detectable concentration  
("sensitivity") for radioligand assays.  
Anal. Biochem. 90: 1-12, 1978.
- 120.- RODBARD D, HUTT DM.  
Statistical analysis of radioimmunoassays and  
immunoradiometric (labelled antibody) assays: a generalized  
iterative least-squares method, for logistic curve fitting.  
Radioimmunoassays and Related Procedures in Medicine.  
International Atomic Energy Agency. Vienna, 1974, pp: 165-192.
- 121.- HAWKER FJ, CHALLAND GS.  
Effect of cutting standard points on curve fitting in  
radioimmunoassay.  
Clin. Chem. 27: 14-17, 1981.
- 122.- BUTLER AR.  
The Jaffé reaction. Identification of the coloured species.  
Clin. Chim. Acta, 59: 227-232, 1975.
- 123.- PRODA L, SIMON W.  
Determination of potassium concentration of serum using a  
highly selective liquid membrane electrode.  
Clin. Chim. Acta, 29: 289-293, 1970.

- 124.- GONZÁLEZ REVALDERÍA J , VILLAFRUELA JJ, SABATER J, LAMAS S, ORTUÑO J.  
Variance analysis by use of a low cost desk top calculator.  
Comput. Biol. Med. 16: 311-317, 1986.
- 125.- GONZÁLEZ REVALDERÍA J, ORTE JM, VILLAFRUELA JJ, LAMAS S, SABATER J, ORTUÑO J.  
One-way variance analysis (ANOVA) in biochemical laboratories and clinical departments using a program designed for micro and minicomputers.  
Revista de la S.E:Q.C. 5: 203, 1986.
- 126.- SONNENBERG A.  
Sequential iteration of bayesian formula by pocket calculator and its use in clinical routine.  
Comput. Biol. Med. 12: 357-360, 1982.
- 127.- MONCADA S, BUNTING S, MULLANE K, THOROGOOD P, VANE JR.  
Imidazole: A selective inhibitor of thromboxane B<sub>2</sub> synthetase.  
Prostaglandins, 17: 729-736, 1979.
- 128.- OLUWOLE S, WANG T, FAWWAG R, SATAKE K, NOWYGRAD R, REEMTSMA K, HARDY MA.  
Use of Indium-111-labelled cells in measurement of cellular dynamics of experimental cardiac allograft rejection.  
Transplantation 31: 51-55, 1981.
- 129.- TILNEY NL, STROM TB, MacPHERSON SG, CARPENTER CB.  
Studies on infiltrating host cells harvested from acutely rejecting rat cardiac allografts.  
Surgery 79: 209-217, 1976.
- 130.- MORLEY J, BRAY MA, JONES RW, NUGTEREN DH, van DORP DA.  
Prostaglandin and thromboxane production by human and guinea-pig macrophages and leucocytes.  
Prostaglandins, 17: 729-736, 1979.

131.- GOLDYNE ME, STOBO JD.

Human monocytes synthesize eicosanoids from T lymphocyte-derived arachidonic acid.

Prostaglandins, 24: 623-630, 1982.

## 7.- APENDICES

### 7.1.- CÁLCULO DE CONCENTRACIONES DE $TxB_2$ MEDIANTE UNA CALCULADORA PROGRAMABLE HP-97.

#### 7.1.1.- MANEJO

Una vez leída la tarjeta por ambas caras, se introducen en parejas los valores de la concentración de los patrones por la tecla A y el valor de  $\% B/B_0$  por la B. Tras ello se presiona la tecla C obteniéndose, por éste orden:

- Coeficiente de correlación
- Ordenada
- Pendiente

A partir de aquí se pueden interpolar los valores de  $\% B/B_0$  de los problemas introduciendo su valor por la tecla D. El valor correspondiente de concentración aparece en la impresora de la máquina. Asimismo, puede realizarse la interpolación inversa: dada la concentración, obtener el valor de  $\% B/B_0$  mediante la tecla E.

7.1.2.- LISTADO DEL PROGRAMA

001	*LBLA	046	*	051	*LBLE	136	RCL6	181	1/X
002	LN	047	P2S	052	LN	137	X	182	RCL1
003	STO1	048	STO4	053	STOE	138	RCL9	183	X
004	RTN	049	P2S	054	RCL6	139	÷	184	1/X
005	*LBLB	050	RCL4	055	RCL4	140	CHS	185	1/X
006	STO2	051	RCL9	056	RCL6	141	RCL8	186	P2S
007	÷	052	÷	057	X	142	+	187	RCL4
008	0	053	P2S	058	X	143	X²	188	X
009	0	054	RCL4	059	e^	144	STO1	189	SPC
010	RCL2	055	*	100	STO2	145	RCL4	190	PRTX
011	-	056	CHS	101	RCL2	146	X²	191	SPC
012	1/X	057	STO5	102	1	147	RCL9	192	P2S
013	RCL2	058	P2S	103	+	148	÷	193	RCL4
014	X	059	RCL6	104	1/X	149	CHS	194	X²
015	LN	060	RCL9	105	RCL2	150	RCL5	195	RCL9
016	STO5	061	÷	106	X	151	+	196	÷
017	RCL5	062	P2S	107	1	152	1/X	197	CHS
018	ENT↑	063	RCL5	108	0	153	RCL1	198	RCL5
019	RCL1	064	+	109	0	154	X	199	+
020	Σ+	065	STO6	110	X	155	CHS	200	1/X
021	RTN	066	P2S	111	RTN	156	STO1	201	STO2
022	*LBLC	067	RCL6	112	*LBLD	157	RCL6	202	RCL4
023	DSP4	068	X²	113	STOE	158	X²	203	RCL9
024	SPC	069	RCL9	114	1	159	RCL9	204	÷
025	P2S	070	÷	115	0	160	÷	205	X²
026	RCL4	071	CHS	116	0	161	CHS	206	RCL2
027	RCL5	072	RCL7	117	RCL6	162	RCL7	207	X
028	X	073	+	118	-	163	-	208	STO2
029	RCL9	074	RCL3	119	1/X	164	RCL1	209	RCL9
030	÷	075	X	120	RCL6	165	+	210	1/X
031	CHS	076	1/X	121	X	166	STO1	211	RCL2
032	RCL8	077	STO2	122	LN	167	RCL9	212	+
033	+	078	RCL1	123	STOE	168	2	213	RCL1
034	STO1	079	X²	124	RCL4	169	-	214	X
035	RCL4	080	RCL2	125	1/X	170	1/X	215	1/X
036	X²	081	*	126	RCL6	171	RCL1	216	1/X
037	RCL9	082	FRTH	127	RCL6	172	X	217	P2S
038	÷	083	1/X	128	RTN	173	STO1	218	RCL6
039	CHS	084	PRTX	129	-	174	RCL4	219	X
040	RCL5	085	P2S	130	*	175	X²	220	PRTX
041	+	086	RCL6	131	e^	176	RCL9	221	RTN
042	STO3	087	PRTX	132	RTN	177	÷	222	R/S
043	RCL3	088	RCL4	133	*LBLA	178	CHS		
044	1/X	089	PRTX	134	P2S	179	RCL5		
045	RCL1	090	RTN	135	RCL4	180	+		

## 7.2.- ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y DE REGRESIÓN

Para analizar la series de datos se realizó un programa en Pascal para un microcomputador Digital Rainbow 100 plus con un sistema operativo CP/M 86/80 y un compilador de Pascal COMPAS de Digital Research. Asimismo, se realizó una versión en Basic de este mismo programa.

### 7.2.1.- MANEJO

Tras la introducción de los datos solicitados, el programa exhibe el siguiente MENU:

- D Corrección de datos
- K Prueba de Kolmogorov-Smirnov
- C ANOVA y prueba de comparación de medias (Scheffé)
- L Listar datos
- B Prueba de Barlett
- M Prueba de medias con heteroscedasticidad
- R Nuevo análisis
- G Transformación  $\log_e x$
- F Transformación  $e^x$
- U Transformación  $x^{1/2}$
- X Transformación  $x^2$
- W Prueba no paramétrica de Welch
- T Análisis de regresión
- E Fin (en la versión Pascal)



El programa permite comprobar las hipótesis del análisis de la varianza y realizar transformaciones de los datos en caso de que no se cumpla alguna de ellas. Sólo se requiere que el muestreo sea aleatorio. Asimismo, permite realizar el análisis de regresión de dos series con el mismo número de datos y pruebas no paramétricas.

Cada opción puede ejecutarse independientemente de las demás.

### 7.2.2.- LISTADO DEL PROGRAMA

```

PROGRAM ONE_WAY_ANOVA; (* 28 JULY 1986 *)
CONST
  BELL = 07;
TYPE
  B_ARRAY= ARRAY [1..10] OF INTEGER;
  V_ARRAY= ARRAY [1..10] OF REAL;

VAR
  N: ARRAY [1..10,1..48] OF REAL;
  Q,M,F,S,K,D,W: V_ARRAY;
  B: B_ARRAY;
  A,V: INTEGER;

PROCEDURE WAIT;
CONST
  ENTER = 013;
VAR
  CHARAC:CHAR;
BEGIN
  READ(KBD,CHARAC);
  WHILE CHARAC <> ENTER DO
    BEGIN
      WRITE(BELL);
      READ(KBD,CHARAC)
    END
  END;

PROCEDURE CLEAR_HOME;
CONST
  CLSH=027'[0;0H'027'[2J';
BEGIN
  WRITE(CLSH)
END;

PROCEDURE HEAD1;
BEGIN
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(0,5);
  WRITELN('*****:SS);
  WRITELN('* * :SS);
  WRITELN('* ONE-WAY ANOVA * :SS);
  WRITELN('* * :SS);
  WRITELN('*****:SS);
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS 'ENTER');
  WAIT
END;

FUNCTION UPPER(CHARAC:CHAR):CHAR;
BEGIN
  IF CHARAC IN ['a'..'z'] THEN UPPER:=CHR(ORD(CHARAC)-32)
  ELSE UPPER:=CHARAC
END;

FUNCTION CORRECT_ANSWER:BOOLEAN;
VAR
  CHARAC:CHAR;
BEGIN
  READ(KBD,CHARAC);
  CHARAC:=UPPER(CHARAC);

```

```

WHILE NOT (CHARAC IN ['Y','N']) DO
  BEGIN
    WRITE(BELL);
    READ(KBD,CHARAC);
    CHARAC:=UPPER(CHARAC)
  END;
  WRITE(CHARAC);
  CORRECT_ANSWER:= (CHARAC = 'Y' )
END;

PROCEDURE ZEROS;
VAR
  I: INTEGER;
BEGIN
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      SCIJ:= 0;
      KCIJ:= 0;
      WCIJ:= 0;
      DCIJ:= 0
    END
  END;

PROCEDURE CALC1;
VAR
  I,J: INTEGER;
BEGIN
  V:=0;
  FOR I:=1 TO A DO
    BEGIN
      FOR J:=1 TO BCIJ DO
        BEGIN
          SCIJ:= SCIJ + NCI,JJ;
          KCIJ:= KCIJ + ( NCI,JJ * NCI,JJ );
          DCIJ:= SQRT (( KCIJ - ( SCIJ * SCIJ ) / BCIJ )
            / ( BCIJ - 1 ));
          WCIJ:= WCIJ + 1;
          V:= V + 1
        END;
      MCIJ:= SCIJ / WCIJ;
      FCIJ:= ( SCIJ * SCIJ ) / WCIJ
    END
  END;

END;

(*I GETDATA.PAS*)
(*I OPTIOND.PAS*)
(*I OPTIONK.PAS*)
(*I OPTIONC.PAS*)
(*I OPTIONL.PAS*)
(*I OPTIONB.PAS*)
(*I OPTIONM.PAS*)
(*I OPTIONSS.PAS*)
(*I OPTIONT.PAS*)

PROCEDURE RESTART;
BEGIN
  ZEROS;
  GETDATA;
  CALC1
END;

```

PROCEDURE OPTIONS;

VAR

OPTION:CHAR;

PROCEDURE CALL\_OPTION(OPTION:CHAR):

BEGIN

CASE OPTION OF

'D':CORRECTION;

'K':KOLMOGOROV;

'C':ANOVA\_COMP;

'L':LIST;

'B':BARLETT;

'M':MEAN;

'R':RESTART;

'G':LOG;

'F':INV\_LOG;

'U':ROOT;

'X':INV\_ROOT;

'W':WELCH;

'T':REGRESSION;

'E':

END

END; (\* CALL\_OPTION \*)

BEGIN

REPEAT

CLEAR\_HOME;

GOTOXY(33,2);

WRITE('MENU');

GOTOXY(32,3);

WRITE('====');

GOTOXY(0,5);

WRITELN(' :19,'D DATA CORRECTION '):

WRITELN(' :19,'K KOLMOGOROV-SM'S TEST '):

WRITELN(' :19,'C ANOVA AND MEAN COMP. TEST '):

WRITELN(' :19,'L LIST DATA '):

WRITELN(' :19,'B BARLETT'S TEST '):

WRITELN(' :19,'M MEANS TEST WITH HETEROS. '):

WRITELN(' :19,'R NEW TEST '):

WRITELN(' :19,'G LOG. TRANSF. '):

WRITELN(' :19,'F INV. LOG. TRANSF. '):

WRITELN(' :19,'U ROOT TRANSF. '):

WRITELN(' :19,'X INV. ROOT '):

WRITELN(' :19,'W WELCH'S NON PARAM. TEST '):

WRITELN(' :19,'T REGRESSION '):

WRITELN(' :19,'E END '):

WRITELN;

WRITE(' :19,SELECT BY PRESSING THE INITIAL '):

READ(KBD,OPTION);

OPTION:=UPPER(OPTION);

WHILE NOT

(OPTION IN 'D','K','C','L','B','M','R','G','F','U','X','W','T',

'E'))

BEGIN

WRITE(BELL);

READ(KBD,OPTION);

OPTION:=UPPER(OPTION)

END;

WRITE(OPTION);

CALL\_OPTION(OPTION);

UNTIL OPTION='E';

CLEAR\_HOME

-124-

```
BEGIN
  HEAD1;
  GETDATA;
  CALC1;
  OPTIONS
END.
```

```
PROCEDURE GETDATA; (* 30 JULY 86 *)
VAR
  I,J,L,M:INTEGER;
BEGIN
  A:=0;
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(0,2);
  WRITE('INTRODUCE THE NUMBER OF SERIES TO ANALYZE : ');
  READ(A);
  FOR I:=1 TO A DO
    BEGIN
      M:=0;
      L:=0;
      REPEAT
        CLEAR_HOME;
        BC11:=0;
        GOTOXY(0,2);
        WRITE('INTRODUCE THE NUMBER OF DATA OF SERIE ',I,' : ');
        READ(BC11);
        GOTOXY(0,7);
        WRITE('IS THE NUMBER OF DATA CORRECT?(Y/N): ');
        UNTIL CORRECT_ANSWER;
        SC11:=0;
        KC11:=0;
        WC11:=0;
        DC11:=0;
        CLEAR_HOME;
        GOTOXY(0,2);
        WRITE('INTRODUCE THE DATA OF THE SERIE ',I,' : ');
        FOR J:=1 TO BC11 DO
          BEGIN
            M:=M+1;
            GOTOXY(14*M,L+4);
            WRITE(J:3,' :3);
            READ(NC11,J1);
            IF M = 3 THEN
              BEGIN
                M:=0;
                L:=L+1
              END
            END;
          END;
        GOTOXY(7,20);
        WRITE('PRESS ''ENTER''');
        WAIT
      END
    END;
  END; (* GETDATA *)
```

```
PROCEDURE CORRECTION; (* 30 JULY 1986 *)
                        (* OPTIOND *)
VAR
  R,E,I: INTEGER;
BEGIN
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(0,2);
  WRITE('INTRODUCE THE INDEX OF THE SERIE WITH THE VALUE TO BE CHANGED
  REPEAT
    READ(R);
    IF (R<1) OR (R>A) THEN
      BEGIN
        WRITE(BELL);
        GOTOXY(63,2);
        WRITE('':16);
        GOTOXY(63,2)
      END
    UNTIL (R>=1) AND (R<=A);
  GOTOXY(0,4);
  WRITELN('INTRODUCE THE INDEX OF THE PLACE OCCUPIED IN THE SERIE ',R);
  WRITE('BY THE VALUE-TO BE CHANGED : ');
  READ(E);
  GOTOXY(0,8);
  WRITE('PRESENT VALUE           : ',NCR,EJ:8:2);
  GOTOXY(0,10);
  WRITE('INTRODUCE THE NEW VALUE : ');
  READ(NCR,EJ);
  ZEROS;
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('WAIT A MOMENT');
  CALCI
END; (* OPTIOND ==> CORRECTION *)
```

```
PROCEDURE KOLMOGOROV; (* 25 JULY 1986 *)
(* OPTIONK *)
```

```
VAR
```

```
Z,Y,AK,L: ARRAY [1..10,1..48] OF REAL;
X: ARRAY [1..2,1..10] OF REAL;
U,VK: V ARRAY;
H,I,J,PI,REM: INTEGER;
TEMP: REAL;
```

```
PROCEDURE CORRECT_BH(BH: INTEGER; VAR VH: REAL);
BEGIN
```

```
  CASE BH OF
```

```
    4: VH:= 0.417;
    5: VH:= 0.405;
    6: VH:= 0.364;
    7: VH:= 0.348;
    8: VH:= 0.301;
    9: VH:= 0.311;
   10: VH:= 0.294;
   11: VH:= 0.284;
   12: VH:= 0.275;
   13: VH:= 0.268;
   14: VH:= 0.261;
   15: VH:= 0.257;
   16: VH:= 0.250;
   17: VH:= 0.245;
   18: VH:= 0.239;
   19: VH:= 0.235;
   20,21,22,23,24: VH:= 0.231;
   25,26,27,28,29: VH:= 0.203;
   30,31,32,33,34: VH:= 0.187
```

```
  END
```

```
END;
```

```
BEGIN (* KOLMOGOROV *)
```

```
  CLEAR_HOME;
```

```
  GOTOXY(7,20);
```

```
  WRITE('WAIT A MOMENT');
```

```
  FOR H:= 1 TO A DO
```

```
    FOR I:= 1 TO BCH DO
```

```
      ZCH,IJ:= ( NCH,IJ - MCHJ) / DCHJ;
```

```
  FOR H:= 1 TO A DO
```

```
    FOR I:= 1 TO BCH - 1 DO
```

```
      BEGIN
```

```
        PI:= I+1;
```

```
        FOR J:= PI TO BCH DO
```

```
          IF ZCH,IJ > ZCH,JJ THEN
```

```
            BEGIN
```

```
              TEMP:= ZCH,IJ;
```

```
              ZCH,IJ:= ZCH,JJ;
```

```
              ZCH,JJ:= TEMP
```

```
            END
```

```
          END;
```

```
  FOR H:= 1 TO A DO
```

```
    FOR I:= 1 TO BCH DO
```

```
      YCH,IJ:= ( EXP ( 1.6657 * ZCH,IJ )) /
```

```
        ( 1 + EXP ( 1.6657 * ZCH,IJ ));
```

```
  FOR H:= 1 TO A DO
```

```
    FOR I:= 1 TO BCH DO
```

```

BEGIN
  REM:= BCHJ;
  AKCH,11:= ( 1 / REM ) - YCH,11;
  LCH,11:= YCH,11 - ( ( Y-1 ) / REM )
END;
FOR H:= 1 TO A DO
  IF AKCH,11 > AKCH,21 THEN XC1,H1:= AKCH,11
  ELSE
    IF AKCH,21 > AKCH,11 THEN XC1,H1:= AKCH,21;
  FOR H:= 1 TO A DO
    FOR I:= 3 TO BCHJ DO
      IF AKCH,11 > XC1,H1 THEN XC1,H1:= AKCH,11;
    FOR H:= 1 TO A DO
      IF LCH,11 > LCH,21 THEN XC2,H1:= LCH,11
      ELSE
        IF LCH,21 > LCH,11 THEN XC2,H1:= LCH,21;
    FOR H:= 1 TO A DO
      FOR I:= 3 TO BCHJ DO
        IF LCH,11 > XC2,H1 THEN XC2,H1:= LCH,11;
    FOR H:= 1 TO A DO
      IF XC1,H1 >= XC2,H1 THEN UCH1:= XC1,H1
      ELSE IF XC1,H1 < XC2,H1 THEN UCH1:= XC2,H1;
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(3,5);
  WRITE('HIGHEST D');
  FOR H:= 1 TO A DO
    BEGIN
      GOTOXY(14,4+H);
      WRITELN(UCH1:7:2)
    END;
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS ''ENTER''');
  WAIT;
  CLEAR_HOME;
  FOR H:= 1 TO A DO
    BEGIN
      IF BCHJ > 34 THEN
        VKCH1:= 1.031 / BCHJ
      ELSE CORRECT_BH(BCHJ,VKCH1);
      GOTOXY(0,4+H);
      IF UCH1 >= VKCH1 THEN
        WRITE('THE DISTRIBUTION ',H,' IS NOT GAUSSIAN: P < 0.01')
      ELSE
        WRITE('THE DISTRIBUTION ',H,' IS GAUSSIAN')
    END;
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS ''ENTER''');
  WAIT
END; (* OPTIONK ==> KOLMOGOROV *)

```



```

PROCEDURE ANOVA_COMP; (* 22 JULY 1986 *)
(* OPTIONC *)
VAR
  I,J:INTEGER;
  FA,GT,N2,SC,T,T3,TODO:REAL;
  CT,SST,SSG,SSD,MSE,MSD,FS,IS,NO:REAL;
  SA2,VEG,VIG,JO,INA,DX,SAUX:REAL;
BEGIN
  N2:= 0;
  GT:= 0;
  SC:= 0;
  T3:= 0;
  T:= 0;
  TODO:= 0;
  CLEAR_HOME;
  FOR I:=1 TO A DO
    BEGIN
      GT:= GT + SC[I];
      SC:= SC + KC[I];
      T3:= T3 + FC[I];
      T:= T + WC[I];
    END;
  CT:= GT * GT / T;
  SST:= SC - CT;
  SSG:= T3 - CT;
  SSD:= SST - SSG;
  MSE:= SSG / ( A - 1 );
  MSD:= SSD / ( T - A );
  FS:= MSE / MSD;
  IS:= SQRT ( FS );
  FOR I:= 1 TO A DO
    TODO:= TODO + BC[I];
  TODO:= TODO - A;
  GOTOXY(0,3);
  WRITELN('THE VALUE OF CALCULATED FS IS : ',FS:7:2);
  GOTOXY(0,7);
  WRITELN('IF Fcalc. > F tables FOR ',A-1,' AND ',
    TODO:5:2,' D.F. THAT THERE');
  WRITELN('IS AN ADDED COMPONENT OF VARIANCE');
  IF A=2 THEN
    BEGIN
      GOTOXY(0,13);
      WRITE('STUDENT T TEST VALUE : ',IS:7:3)
    END;
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS ''ENTER''');
  WAIT;
  FOR I:= 1 TO A DO
    N2:= N2 + ( WC[I] * WC[I] );
  NO:= ( 1 / ( A - 1 ) ) * ( T - ( N2 / T ) );
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(0,3);
  WRITE('AVERAGE SIZE OF THE SAMPLE : ',NO:7:3);
  SA2:= ( MSE - MSD ) / NO;
  IF SA2 < 0 THEN
    BEGIN
      GOTOXY(0,15);
      WRITE('THERE IS NOT AN ADDED COMPONENT OF VARIANCE')
    END
  END

```

```

END;
GOTOXY(0,7);
WRITE('APPROX. VALUE OF THE ADDED COMPONENT      : ',SA2:7:3);
VEG:= SA2 / ( MSD + SA2 );
VIG:= 1 - VEG;
GOTOXY(13,9);
WRITE('CORR. COEF. BETWEEN GROUPS : ',VEG:7:3);
GOTOXY(13,11);
WRITE('CORR. COEF. INTRA GROUPS   : ',VIG:7:3);
GOTOXY(7,20);
WRITE('PRESS ''ENTER''');
WAIT;
CLEAR_HOME;
GOTOXY(25,3);
WRITE('MEAN COMPARISON TEST');
GOTOXY(0,5);
FOR I:= 1 TO A DO
  WRITELN('MEAN.SERIES ':22,1,' : ',MC11:7:2,'SD : ':24,DC11:7:2);
GOTOXY(7,20);
WRITE('PRESS ''ENTER''');
WAIT;
CLEAR_HOME;
GOTOXY(0,0);
WRITELN('INTRODUCE THE ''F'' VALUE FOR ',A-1,' AND '.
  TODO:5:2,' f.d. AND THE');
WRITE('LEVEL OF SIGNIFICANCE SELECTED : ');
READ(FA);
GOTOXY(0,4);
WRITELN('THE DIFFERENCE OF MEANS BETWEEN SERIES :');
FOR I:= 1 TO A DO
  FOR J:= ( I + 1 ) TO A DO
    BEGIN
      SAUX:= SQRT (( A - 1 ) * FA );
      JO:= 1 / WC11 + 1 / WC11;
      INA:= SAUX * SQRT ( MSD * JO );
      DX:= ABS ( MC11 - MC11 );
      WRITE(I:10,' AND ',J);
      IF INA <= DX THEN
        WRITELN(' IS SIGNIFICANT')
      ELSE
        WRITELN(' IS NOT SIGNIFICANT');
    END;
  WRITELN;
WRITE('FOR THE SELECTED ''P''');
GOTOXY(7,20);
WRITE('PRESS ''ENTER''');
WAIT
END; (* OPTIONC ==> ANOVA *)

```

```
PROCEDURE LIST; (* 22 JULY 1986 *)
(* OPTIONL *)
VAR
  I,J,K,L:INTEGER;
BEGIN
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      K:=0;
      L:=0;
      CLEAR HOME;
      GOTOXY(0,2);
      WRITELN('DATA OF SERIE ',I,' ');
      FOR J:= 1 TO BCII DO
        BEGIN
          K:=K+1;
          GOTOXY(16*K,4+L);
          WRITE(J:3,' ':3,NC(1,JJ:7:2));
          IF K = 3 THEN
            BEGIN
              K:=0;
              L:=L+1
            END
          END;
        END;
      GOTOXY(7,20);
      WRITE('PRESS ''ENTER''');
      WAIT
    END
  END; (* OPTIONL ==> LIST *)
```

```

PROCEDURE BARLETT; (* 24 JULY 1986 *)
(* OPTIONB *)
VAR
  I: INTEGER;
  S2PP, FU, LS2, INV1, INV2, SPPL, CHI2, CHIA, BUE, COR: REAL;
BEGIN
  CLEAR HOME;
  GOTOXY(30,3);
  WRITE('BARLETT'S TEST');
  S2PP:=0;
  LS2:=0;
  INV1:=0;
  INV2:=0;
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      QC11:= DC11 * DC11;
      S2PP:= S2PP + (( QC11 * ( BC11 - 1 )) / ( V - A ))
    END;
  SPPL:= LN ( S2PP ) / LN ( 10 );
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      FU:= LN ( QC11 ) / LN ( 10 );
      LS2:= LS2 + (( BC11 - 1 ) * FU )
    END;
  CHI2:= (( ( V - A ) * SPPL ) - LS2 ) * 2.3026;
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      INV1:= INV1 + ( 1 / ( BC11 - 1 ));
      INV2:= INV2 + ( BC11 - 1 )
    END;
  BUE := INV1 - ( 1 / INV2 );
  COR := 1 + ( 1 / ( 3 * ( A - 1 ))) * BUE;
  CHIA:= CHI2 / COR;
  GOTOXY(0,6);
  WRITE('SQUARED CHI ADJUSTED : ',CHIA:5:2);
  GOTOXY(0,8);
  WRITE('FOR ',A-1,' DEGREES OF FREEDOM');
  GOTOXY(0,10);
  WRITELN('COMPARE WITH SQUARED CHI IN TABLES FOR P < 0.01;');
  WRITELN('IF CHI2 calc. > CHI2 tab., THEN THERE IS HETEROCEDASTICITY. AND');
  WRITELN('YOU MUST PERFORM AN APPROX. TEST OF SIMILARITY BETWEEN REGRESSIONS');
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS ''ENTER''');
  WAIT
END; (* OPTIONB ==> BARLETT *)

```

```

PROCEDURE MEAN;      (* 22 JULY 1986 *)
                    (* OPTIONM *)
AR
  I,NU1: INTEGER;
  GME,OH,TCW,SSGP,JE,JOPE,FPR,NU2,WI,WY: REAL;
  G,E,C: V_ARRAY;
BEGIN
  WI:= 0;
  WY:= 0;
  OH:= 0;
  JE:= 0;
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(18,2);
  WRITE('APPROX. TEST OF SIMILARITY BETWEEN MEANS');
  GOTOXY(18,4);
  WRITE('(for samples with heterogeneous variances)');
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      GC13:= DC13 * DC13;
      CC13:= BC13 / GC13;
      EC13:= CC13 * MC13
    END;
  FOR I:= 1 TO A DO
    WI:= WI + CC13;
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      GC13:= 1 - ( CC13 / WI );
      WY:= WY + EC13
    END;
  GME:= WY / WI;
  FOR I:= 1 TO A DO
    OH:= OH + ( MC13 * EC13 );
  TCW:= ( WY * WY ) / WI;
  SSGP:= OH - TCW;
  FOR I:= 1 TO A DO
    JE:= JE + ( ( GC13 * GC13 ) / ( BC13 - 1 ) );
  JOPE:= 1 + ( ( 2 * ( A - 2 ) / ( A * A - 1 ) ) * JE );
  FPR:= ( SSGP / ( A - 1 ) ) / JOPE;
  NU1:= A - 1;
  NU2:= ( A * A - 1 ) / ( 3 * JE );
  GOTOXY(0,7);
  WRITE('THE CALCULATED Fs VALUE FOR ',NU1,' AND ',
        NU2:6:2,' DEGREES OF FREEDOM', ' IS : ',FPR:7:2);
  GOTOXY(0,10);
  WRITE('IF F calc. > F tab. FOR THIS d.f. AND THE SELECTED 'P', THEN
  WRITE('SAMPLES BELONG TO DIFFERENT POPULATIONS');
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS 'ENTER'');
  WAIT;
END; (* OPTIONM ==> MEAN *)

```

```
(* OPTIONS G, F, U, X, W; SUBROUTINE ZEROS1      *)
(* 22 JULY 1986 *)
```

```
PROCEDURE ZEROS1;
VAR
```

```
  I:INTEGER;
BEGIN
  ZEROS;
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(7,7);
  WRITE('WAIT A MOMENT')
END;
```

```
PROCEDURE LOG; (* OPTIONG *)
```

```
VAR
  I,J:INTEGER;
BEGIN
  ZEROS1;
  FOR I:= 1 TO A DO
    FOR J:= 1 TO BC11 DO
      NCI,JJ:= LN ( NCI,JJ );
    CALC1
  END; (* OPTIONG ==> LOG *)
```

```
PROCEDURE INV_LOG; (* OPTIONE *)
```

```
VAR
  I,J:INTEGER;
BEGIN
  ZEROS1;
  FOR I:= 1 TO A DO
    FOR J:= 1 TO BC11 DO
      NCI,JJ:= EXP ( NCI,JJ );
    CALC1
  END; (* OPTIONE ==> INV_LOG *)
```

```
PROCEDURE ROOT; (* OPTIONU *)
```

```
VAR
  I,J:INTEGER;
BEGIN
  ZEROS1;
  FOR I:= 1 TO A DO
    FOR J:= 1 TO BC11 DO
      NCI,JJ:= SQRT ( NCI,JJ );
    CALC1
  END; (* OPTIONU ==> ROOT *)
```

```
PROCEDURE INV_ROOT; (* OPTIONX *)
```

```
VAR
  I,J:INTEGER;
BEGIN
  ZEROS1;
  FOR I:= 1 TO A DO
    FOR J:= 1 TO BC11 DO
      NCI,JJ:= NCI,JJ * NCI,JJ;
    CALC1
  END; (* OPTIONX ==> INV_ROOT *)
```

```

PROCEDURE WELCH; (* OPTIONW *)
VAR
  I: INTEGER;
  WIW,WIX,XIW,NU11,NU22: REAL;
  MIX1,MIX2,MIX3,MIX31,MIX32,MIX33,MIX34,MIX5: REAL;
BEGIN
  MIX33:= 0;
  MIX31:= 0;
  MIX32:= 0;
  MIX33:= 0;
  MIX34:= 0;
  WIW:= 0;
  WIX:= 0;
  MIX1:= 0;
  MIX3:= 0;
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(22,5);
  WRITE('WELCH'S NON PARAMETRIC TEST');
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      WIW:= WIW + ( BCII / ( DCII * DCII ));
      WIX:= WIX + ( MCII * ( BCII / ( DCII * DCII )));
    END;
  XIW:= WIX / WIW;
  FOR I:= 1 TO A DO
    MIX1:= MIX1 +
      (( BCII / ( DCII * DCII )) * ( MCII - XIW ) * ( MCII - XIW));
  MIX2:= MIX1 / ( A - 1 );
  FOR I:= 1 TO A DO
    BEGIN
      MIX31:= 1 - (( BCII / ( DCII * DCII )) / WIW );
      MIX32:= MIX31 * MIX31;
      MIX33:= MIX32 * ( 1 / ( BCII - 1 ));
      MIX33:= MIX33 + MIX33
    END;
  MIX34:= MIX33 * 2 * ( A - 2 ) / ( A * A - 1 );
  MIX3:= MIX34 + 1;
  MIX5:= MIX2 / MIX3;
  NU11:= A - 1;
  NU22:= MIX33 * 3 / ( A * A - 1 );
  NU22:= 1 / NU22;
  GOTOXY(0,9);
  WRITE('V2 VALUE : ',MIX5:7:2);
  GOTOXY(0,12);
  WRITELN('Compare the F value for ',NU11:5:2
    , ' and ',NU22:5:2, ' degrees of freedom '
    , 'and desired ''P''');
  WRITE('If V2 > F, then there is a difference between the groups');
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS ''ENTER''');
  WAIT
END; (* OPTIONW ==> WELCH *)

```

```

PROCEDURE REGRESSION; (* 22 JULY 1986 *)
(* OPTIONT *)
VAR
  J, O: INTEGER;
  IX, IY, SXY, BUNO, BDOS, SCR, SCA, SCB, SCE, FR1, FR2, FR3, RDOS, P: REAL;
BEGIN
  SXY:= 0;
  O:= 0;
  P:= 0;
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(29,2);
  WRITE('REGRESSION ANALYSIS');
  IF ( A <> 2 ) OR ( BC11 <> BC21 ) THEN
    BEGIN
      GOTOXY(0,8);
      WRITELN('THIS ANALYSIS CAN ONLY BE PERFORMED WITH TWO DATA GROUPS');
      WRITE('AND THE SAME NUMBER OF DATA IN EACH ONE');
      GOTOXY(7,20);
      WRITE('PRESS ''ENTER''');
      WAIT
    END
  ELSE
    BEGIN
      FOR J:= 1 TO BC11 DO
        SXY:= SXY + ( NC11,J1 * NC21,J1 );
        BDOS:= ( SXY - ( SC11 * SC21 / BC11 ) ) /
          ( KC11 - ( SC11 * SC11 / BC11 ) );
        BUNO:= MC21 - ( BDOS * MC11 );
        SCR:= ( BUNO * SC21 ) + ( BDOS * SXY );
        SCA:= SCR - ( SC21 * SC21 ) / SC11;
        SCB:= SCR - ( SC21 * SC21 ) / BC11;
        SCE:= KC21 - SCR;
        FR1:= ( BC11 - 2 ) / 2 * SCR / SCE;
        FR2:= ( BC11 - 2 ) * SCA / SCE;
        FR3:= ( BC11 - 2 ) * SCB / SCE;
        RDOS:= SCB / ( KC21 - ( SC21 / BC11 ) );
        GOTOXY(0,5);
        WRITE('y = ', BUNO:7:3, ' + ( ', BDOS:7:3, ' ) x');
        GOTOXY(0,7);
        WRITE('r = ', SQRT ( RDOS ):7:3);
        GOTOXY(0,10);
        WRITELN('F1 = ', FR1:9:3);
        WRITELN('F2 = ', FR2:9:3);
        WRITELN('F3 = ', FR3:9:3);
        GOTOXY(0,14);
        WRITELN('IF F1 > F tab. FOR 2, AND ', BC11 - 2,
          ' d.f. AND THE DESIRED ');
        WRITELN('LEVEL OF SIGNIFICANCE, THEN A AND B ARE SIMULTANEOUSLY ',
          'DIFFERENT FROM 0. ');
        WRITELN('IF F2 OR F3 > F tab. FOR 1 AND ', BC11 - 1,
          ' d.f. AND THE SELECTED LEVEL ');
        WRITELN('OF SIGNIFICANCE, THEN THE ORDINATE OR THE SLOPE ARE ',
          'DIFFERENT FROM 0 ');
        GOTOXY(7,20);
        WRITE('PRESS ''ENTER''');
        WAIT;
        CLEAR_HOME;
        GOTOXY(7,7);
    END
  END

```



```

WRITE('DO YOU WANT TO INTERPOLATE ? ( Y/N ) ');
IF CORRECT_ANSWER THEN
  BEGIN
    REPEAT
      CLEAR_HOME;
      GOTOXY(7,10);
      WRITE('GIVEN Y DO YOU WANT X, OR VICEVERSA ? ( 1/2 ) ');
      GOTOXY(7,13);
      IF 0 = 1 THEN
        BEGIN
          WRITE('INTRODUCE THE Y VALUE : ');
          READ(P);
          IX:= ( P - BUNO ) / BDOS;
          GOTOXY(7,16);
          WRITE('X = ',IX:7:3);
        END
      ELSE
        BEGIN
          WRITE('INTRODUCE THE X VALUE : ');
          READ(P);
          IY:= BUNO + BDOS * P;
          GOTOXY(7,16);
          WRITE('Y = ',IY:7:3);
        END;
      GOTOXY(7,19);
      WRITE('ANOTHER INTERPOLATION ? ( Y/N ) ');
    UNTIL (NOT CORRECT_ANSWER)
  END; (* DE INTERPOLAR *)
  CLEAR_HOME;
  GOTOXY(28,5);
  WRITE('STATISTICAL DATA');
  GOTOXY(0,9);
  WRITELN(' :26, SUM X = ',SC13:11:3);
  WRITELN(' :26, SUM Y = ',SC23:11:3);
  WRITELN(' :26, SUM X2 = ',KC13:11:3);
  WRITELN(' :26, SUM Y2 = ',KC23:11:3);
  WRITELN(' :26, SUM XY = ',SXY:11:3);
  WRITELN(' :26, N = ',BC13:7);
  GOTOXY(7,20);
  WRITE('PRESS "ENTER"');
  WAIT
END
END; (* OPTION1 ==> REGRESSION *)

```

